



Universitat de Girona

Escola Politècnica Superior

Treball Fi de Carrera

Estabilització del color de la fracció cel·lular de sang de porc
deshidratada per atomització

Vist-i-plau

Dr. Jaume Puig i Bargues

Coordinador de l'estudi d'Enginyeria Tècnica Agrícola
especialitat en Indústries Agràries i Alimentàries

Vist-i-plau

Dra. Elena Saguer Hom

Directora del TFC

P/TFC segons el que es disposa en els plans d'estudis d'E.T.A.I.A.A. de la
Universitat de Girona per Montse Amatller i Rovira.

9 de Gener del 2009

AGRAÏMENTS

A L'Elena Saguer, per la seva gran ajuda i aclariment de tots els dubtes a l'hora de realitzar i redactar aquest treball.

A la Paula, per la seva cooperació en les tasques de recerca.

A l'Anna Maria i la Sílvia per la seva ajuda i companyia en el laboratori.

A en Xevi, per ser sempre al meu costat ajudant en tot el que em faci falta.

Als meus pares i família, per recolzar-me en tot moment.

Al Departament d'EQATA per procurar tots els mitjans necessaris.

ÍNDEX

RESUM	III
PARAULES CLAU	V
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. El sector carni	1
1.2. Subproductes de la indústria càrnia	3
1.3. Potencial contaminant de la sang de porc	6
1.4. La sang de porc com a subproducte	8
1.4.1. Sistemes industrials de recollida de sang	9
1.5. Les fraccions de la sang de porc	11
1.5.1. Plasma	12
1.5.2. Fracció cel·lular	13
1.5.2.1. Hemoglobina	15
1.5.2.2. El color de l'hemoglobina	17
1.6. Propietats funcionals de la fracció cel·lular	18
1.7. Sistemes de conservació de la sang i les seves fraccions	19
1.8. Objectius del treball	21
2. MATERIAL I MÈTODES	23
2.1. Disseny experimental	23
2.1.1. Proves preliminars	23
2.1.2. Assaig final	25
2.2. Obtenció de les mostres de sang	26
2.3. Obtenció del concentrat d'hemoglobina	26
2.3.1. Obtenció de la fracció cel·lular per centrifugació	28
2.3.2. Hemòlisi de la fracció cel·lular	28
2.3.3. Addició d'agents per a l'estabilització del color	29
2.3.4. Deshidratació per atomització	29
2.4. Mesura dels paràmetres de color	30

2.5. Determinació de les diferents formes d'hemoglobina	32
2.6. Tractament estadístic de les dades	34
3. RESULTATS	35
3.1. Proves preliminars	35
Experiment 1: Efecte dels agents quelants àcid nicotínic i nicotinamida	35
Experiment 2: Efecte combinat de la nicotinamida i l'àcid ascòrbic	37
Experiment 3: Acció combinada dels agents quelants amb glucosa	38
Experiment 4: Combinació d'àcid nicotínic amb diferents concentracions de glucosa	40
Experiment 5: Combinació d'àcid nicotínic amb sucres reductors i no reductors	43
3.2. Efecte de l'addició d'agents quelants i/o glucosa sobre l'estabilització del color de l'hemoglobina durant la deshidratació i el període d'emmagatzematge	46
3.2.1. Efecte sobre els percentatges dels diferents hemoderivats	47
3.2.2. Efecte sobre el color del concentrat d'hemoglobina deshidratat	50
4. CONCLUSIONS	54
5. BIBLIOGRAFIA	55

RESUM

El color en els aliments és un factor cada vegada més important a nivell industrial el qual s'utilitza per a la caracterització del producte des del punt de vista del control de qualitat i que també serveix com a índex de valor econòmic. Tanmateix, l'ús de colorants alimentaris pot ser controvertit, ja que la seva presència s'associa amb problemes provocats pel seu consum a llarg termini, o perquè es tem que siguin emprats per dissimular deficiències en la qualitat del producte. Aquesta preocupació és una tendència creixent entre els consumidors i ha portat a moltes empreses del sector alimentari a revisar la formulació dels seus productes i substituir, sempre que sigui econòmica i tecnològicament possible, els colorants artificials per colorants naturals.

Encara que es disposa d'una gran varietat de colorants naturals, el seu potencial comercial es veu limitat, en la majoria dels casos, per la baixa disponibilitat de la primera matèria de la que s'extreu. En aquest aspecte, l'hemoglobina procedent de la sang dels escorxadors industrials podria ser una font important de colorant vermell natural degut a les grans quantitats generades diàriament. A més, seria una forma de donar sortida a un dels subproductes més problemàtics de la indústria càrnia, evitant que anés a parar a les aigües residuals.

Tot i que s'ha determinat que la deshidratació per atomització és un bon sistema de conservació per aquest compost i relativament econòmic, el seu ús com a colorant vermell natural queda supeditada al fet de trobar alguna substància o sistema capaç de protegir-la de l'oxidació durant aquest procés de deshidratació i el posterior període d'emmagatzematge, ja que l'hemoglobina és poc estable i es poden produir canvis en el seu color. L'hemoglobina presenta un color vermell brillant quan el ferro hèmic, responsable del color, es troba en forma reduïda i lligat a una molècula d'oxigen. La seva desoxigenació comporta un canvi a color porpra. Tanmateix, l'oxidació del ferro confereix a la molècula un indesitjable color marró.

En l'estudi que aquí es presenta es pretén establir el color de l'hemoglobina de sang porcina tant durant la seva deshidratació per atomització com durant l'emmagatzematge a temperatura ambient de la pols obtinguda afegint al concentrat d'hemoglobina, prèviament a la deshidratació, combinacions de diferents substàncies que puguin actuar de manera complementària en l'estabilització del ferro hèmic enfront la seva oxidació. Els agents quelants, àcid nicotínic (AN, 2 % p/v) i nicotinamida (Nam, 2,5 % p/v), els quals en principi poden complexar-se amb el ferro, ja havien mostrat un cert efecte protector, tot i que limitat, en estudis previs quan s'aplicaven individualment. L'objectiu d'aquest treball és determinar si la seva combinació amb agents antioxidants comporta una millora en l'estabilització de la forma reduïda de l'hemoglobina tant durant la deshidratació per atomització com durant l'emmagatzematge de la pols a temperatura ambient. Després d'una sèrie de proves prèvies considerant diferents compostos, es va escollir assajar la combinació d'un agent quelant amb glucosa, un sucre reductor, a una concentració relativament elevada (10 % p/v).

Els resultats obtinguts han mostrat que la combinació d'un agent quelant amb glucosa és realment efectiva en l'estabilització del ferro hèmic, especialment en el cas de la Nam obtenint-se en aquest cas majors percentatges de ferrohemoglobina lligada (LHb) i menors de metahemoglobina (metaHb) que en qualsevol dels tractaments afegint només una de les substàncies. Aquests efectes sobre l'estat d'oxidació de la molècula d'hemoglobina es tradueixen en millores en el seu color. En qualsevol dels dos tractaments combinats, es va observar un efecte més aviat additiu entre els agents quelants i el sucre reductor sobre l'estabilització del ferro essent, però, aquest darrer compost el principal responsable de l'efecte protector.

Donat que les mostres a les quals se'ls afegia glucosa (sola o en combinació amb un agent quelant) presenten valors d'aigua residual de la pols més elevats que en la resta de tractaments és probable que aquesta actués com a barrera física enfront l'atac oxidatiu.

PARAULES CLAU

Escorxadors industrials

Subproductes

Sang de porc

Fracció cel·lular

Hemoglobina

Deshidratació per atomització

Color

CIE L*, a*, b*

Àcid nicotínic

Nicotinamida

Glucosa

1. INTRODUCCIÓ

1.1. El sector carni

A Espanya, la indústria alimentària és el primer sector industrial del país, amb la indústria càrnia essent el subsector més important. Segons reflecteixen les dades publicades pel Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2006), dels aproximadament 76 985 milions d'euros de despesa alimentària a Espanya al 2005, el 20,6 % corresponia a la indústria càrnia i derivats (15 829 milions d'euros), per sobre d'altres sectors com el de la pesca (13,3 %) o el làctic (10,7 %) (Aice, 2006). Les comunitats autònomes que destaquen pel que fa a ventes netes en la indústria agroalimentària són Catalunya amb un percentatge del 21,8 %, Andalusia amb el 15,6 %, Castella i Lleó amb el 9,5 %, i la Comunitat Valenciana amb el 8,1 % (MAPA, 2006).

Espanya és un gran productor de carn, especialment de porcí, essent-ne el quart productor mundial per darrera de Xina, Estats Units i Alemanya (Aice, 2006). Per contra, s'allunya dels primers llocs en la producció mundial pel que fa a la carn de boví, encapçalats per EE.UU. i Brasil, mentre que en producció de carn d'oví està en el segon lloc dins de la UE (MAPA, 2005). Dels quasi 5,5 milions de tones de carn que es van produir en el nostre país al 2005, destaca el fet que més de la meitat (57 %) corresponien a la carn de porcí. La resta de la producció es repartia entre la carn d'aviram (1,2 milions de tones), de boví (al voltant de 715 000 tones), d'oví (al voltant de 224 000 tones), de conill (per sobre de les 70 000 tones), de caprí (unes 13 000 tones) i d'equí (unes 5000 tones) (MAPA, 2006).

Tanmateix, només cinc comunitats autònomes concentren les tres quartes parts de la totalitat del cens nacional de porcí, encapçalat per Catalunya, seguida per Aragó, Castella i Lleó, Andalusia i Murcia (Figura 1.1).

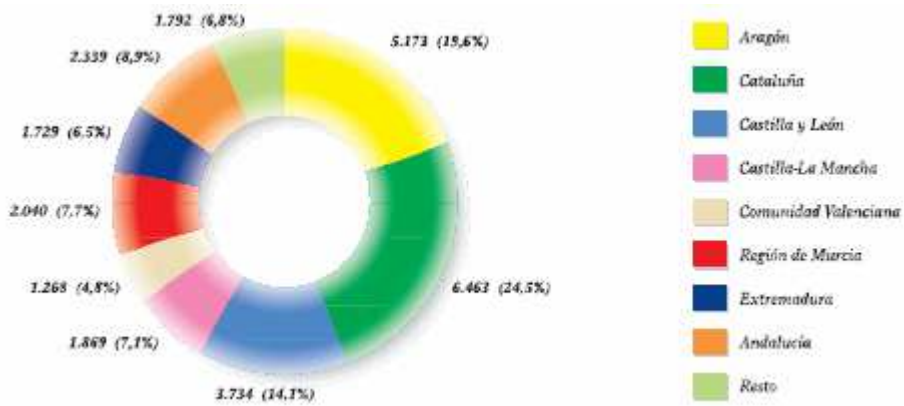


Figura 1.1. Distribució del cens total de bestiar porcí per Comunitats Autònomes (MAPA, 2006)

A Catalunya, la indústria càrnia és el principal sector agroalimentari. Factura anualment més de 4000 milions d'euros, xifra que suposa el 30,2 % de la producció ramadera i el 10,4 % de la producció final agrària (PRODECA, 2006).

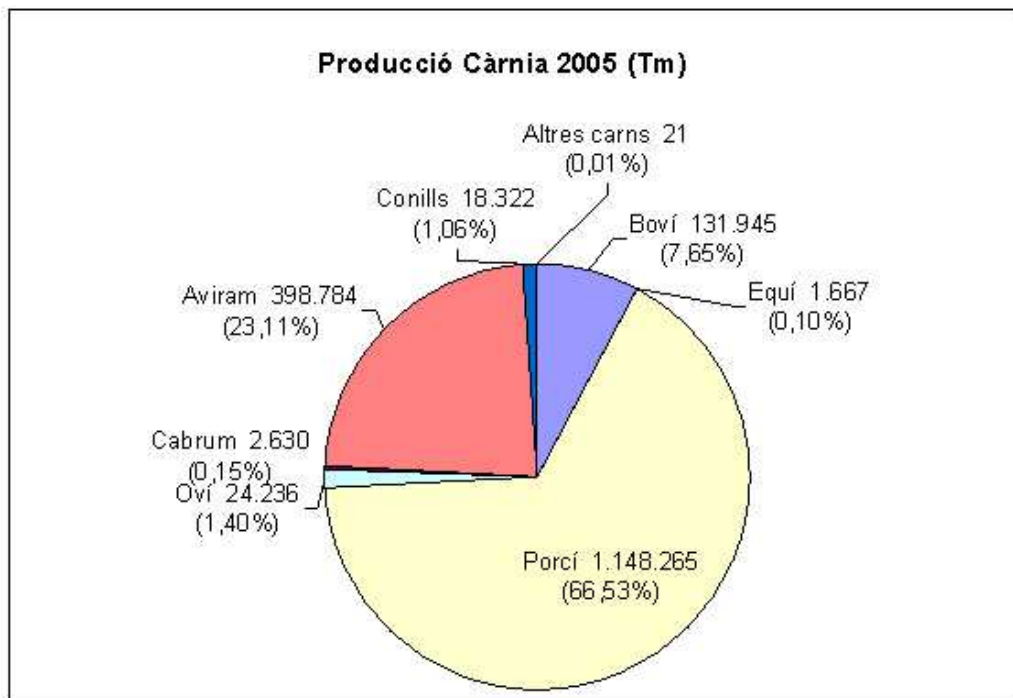


Figura 1.2. Producció càrnia a Catalunya durant el 2005 (FECIC, 2005)

La producció de carn a Catalunya va superar els 1,7 milions de tones al 2005. Més de la meitat (66,53 %) corresponien a la carn de porcí; la resta de la

producció es repartia entre la carn d'aviram (23,11 %), de boví (7,65 %), d'oví (1,40 %), de conill (1,06 %), de cabrum (0,15 %) i la d'equí (0,10 %) (Figura 1.2).

1.2. Subproductes de la indústria càrnia

Un dels problemes més importants que presenta la indústria càrnia actualment és la gran quantitat de productes secundaris que se'n generen: els subproductes i els residus.

Els subproductes són tots aquells productes secundaris derivats del sacrifici de l'animal amb un valor econòmic potencial, que fa possible el seu aprofitament (Booren i Weis, 1988). Però, perquè un subproducte pugui ser utilitzat industrialment, és necessari que compleixi certs requeriments: s'ha de generar un volum suficient i disposar d'un mètode de conservació adequat; el seu procés de transformació ha de ser viable; i el producte que se n'obtingui ha de tenir sortida al mercat (Rodríguez, 1994). Si no es compleixen aquests requisits, el subproducte s'haurà de tractar com un residu.

Perquè la indústria càrnia sigui econòmicament competitiva s'han d'utilitzar els subproductes de forma efectiva. Quan no es pot actuar sobre el principi de la minimització degut a les grans produccions de carn, només es pot actuar sobre l'aprofitament. Sinó, es perd una font important d'ingressos i, a més, es gasta una quantitat important de diners en la seva eliminació.

A finals dels anys 90 i començament del 2000, l'Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), la febre aftosa porcina i la contaminació de la carn de pollastre amb dioxines van provocar diverses crisis alimentàries degut a la utilització d'alguns subproductes d'origen animal en l'alimentació animal. Això va donar lloc a un canvi en la política de seguretat alimentària de la UE. Van entrar en vigor noves reglamentacions més estrictes en la gestió i utilització dels subproductes d'origen animal (Reglament CE-1774/2002, de 3 d'octubre del 2002). Aquesta nova situació va afectar en especial el sector carni, ja que en

aquests establiments és on es realitza la separació entre el que és apte per al consum humà i el que, per motius comercials o sanitaris, és considerat un subproducte.

Els escorxadors, les sales d'especejament i les indústries càrnies són les responsables de realitzar la separació d'aquests subproductes en tres categories i les encarregades de realitzar un seguiment fins al seu destí, mitjançant la seva valorització o la seva destrucció. Segons els articles 4, 5 i 6 del reglament CE-1774/2002, de 3 d'octubre del 2002, les diferents categories en les que es classifiquen els subproductes generats són:

- **Categoria 1:** subproductes no aptes per al consum humà ni animal, que provenen d'animals infectats o sospitosos d'estar infectats per una EET (Encefalopatia Espongiforme Transmissible); també comprèn productes derivats d'animals als que se li hagin administrat substàncies prohibides o que continguin residus de contaminants mediambientals; i tot el material d'origen animal recollit en depurar les aigües residuals de les plantes de transformació de la categoria 1. Aquests materials no tenen possibilitat de valorització i han de ser enviats a una planta de tractament autoritzada que s'encarregui de la seva gestió i eliminació.
- **Categoria 2:** subproductes no aptes per al consum humà ni animal, però que poden tenir una certa valorització que s'ha de tenir en compte durant la seva gestió. Són materials d'aquesta categoria, per exemple, els fems i el contingut del tub digestiu, materials d'origen animal recollits en depurar les aigües residuals d'escorxadors, productes d'origen animal que continguin residus de medicaments veterinaris i contaminants. A través d'una planta de tractament autoritzada, aquests materials es poden valoritzar com a fertilitzants orgànics o per a altres usos tècnics, excepte en cosmètics, fàrmacs i productes sanitaris.
- **Categoria 3:** els materials d'aquesta categoria comprenen tant parts d'animals sacrificats que es consideren aptes per al consum humà com parts d'animals sacrificats no aptes per al consum humà per motius

comercials; aquests últims, però, han de procedir de canals que sí són aptes per al consum humà i que no presenten cap signe de malaltia transmissible als éssers humans o als animals. També formen part d'aquesta categoria altres subproductes com sang, pells, banyes, llana, pèl i plomes procedents d'animals declarats aptes per al sacrifici que no presenten signes clínics de cap malaltia transmissible a través d'aquests productes als éssers humans o als animals. Aquests materials es poden enviar a una planta de tractament autoritzada per a la seva valorització.

Segons l'annex VII del reglament CE-1774/2002, s'especifica que només es pot utilitzar per a la producció de productes derivats de la sang, l'obtinguda com un material de la categoria 3, sempre i quan compleixi les normes microbiològiques fixades per aquest reglament. Si bé està en vigor la prohibició del reglament CE-999/2001, sobre l'ús de la sang i els seus derivats en l'alimentació animal, principalment en remugants (boví, oví i caprí), el reglament CE-829/2007 de 28 de juny del 2007 parla de la conveniència d'aplicar requisits menys severs a les proteïnes animals transformades derivades de la sang de porcí perquè cap dada científica indica que existeixi un risc de transmissió d'EET dels porcs. Així doncs, només la sang d'animals no remugants que superin tant el control *ante mortem* com el *post mortem* pot ser processada per obtenir hemoderivats que es puguin destinar a l'alimentació humana, animal o a la indústria farmacèutica i mèdica.

En el cas de les indústries càrnies i les sales d'especejament, els subproductes generats durant el procés són quasi exclusivament de la categoria 3. Aquests subproductes, basats principalment en greixos, sèu, sang, retalls de carn, ossos, cartílags, trossos sense valor comercial, budells nets, etc., tenen la possibilitat de ser valoritzats i poden generar un benefici econòmic (Taula 1.1).

Taula 1.1. Aplicacions de subproductes d'origen animal (American Meat Institute,1958; Levie, 1976)

Algunes aplicacions dels subproductes d'origen animal
<ol style="list-style-type: none">1. Menuts o despulles aptes per al consum humà.2. Greixos comestibles per a la fabricació de margarines, productes de pastisseria, dolços i xiclets.3. Ossos provinents de desossat mecànic per fabricar sopes, botons, mànecs de ganivets, farines d'ossos, diferents varietats de ceràmica o utilitzats en el refinat del sucre.4. Sang per a consum humà, per fabricar farina de sang, adhesius o fertilitzants.5. Renina per a la fabricació de formatges.6. Intestins per a tripes d'embotits, cordes d'instruments musicals o material de sutures quirúrgiques.7. Gelatina per a productes de pastisseria, rebosteria i gelateria.8. Glicerina per a diferents usos industrials: fabricació de nitroglicerina, bases de cremes, solvents, excipients per a medicaments, conservadors alimentaris, agents plastificants o humectants.9. Substàncies terapèutiques: hormones, albúmina, bilirubina, epinefrina, insulina, extractes hepàtics, pepsina, testosterona, tromboplastina, timocrescina i tiroxina.10. Òrgans per a implantacions quirúrgiques.11. Pinsos compostos per a ramaderia, gossos, gats i peixos.12. Pells i cuirs.13. Pèls per a brotxes, catifes, aïllaments i equipaments esportius. Plomes per a aïllaments, coixins, articles esportius i pinsos per animals.14. Llanes i extractes de lanolina.15. Greixos no comestibles de diversos usos industrials (fabricació de pneumàtics, lubricants, insecticides i germicides).16. Fertilitzants i adobs.17. Cola per a fusteria.

1.3. Potencial contaminant de la sang de porc

Si es té en compte que el volum aproximat de sang que es pot recollir durant el sacrifici és d'uns 2,5-3 L per porc, al 2005 es van produir unes 40 000 tones de sang de porc només a Catalunya. Però encara no s'ha trobat una solució per canalitzar aquesta sobreproducció derivada d'una activitat tan important a Catalunya com és el sacrifici del bestiar en els escorxadors industrials.

Dins d'aquesta indústria, és en els escorxadors on es concentra la problemàtica mediambiental d'aquest sector. Els efluent generats, en general, tenen una càrrega contaminant molt elevada (Taula 1.2). Una part important d'aquesta càrrega correspon a la presència de molècules biològiques que requereixen una gran quantitat d'oxigen per a la seva depuració (DBO₅).

Taula 1.2. Càrrega contaminant en els efluents d'un escorxador porcí (Collado, 1995)

Càrrega contaminant en un escorxador de porcí							
operacions	pH	DBO₅ (mg/L)	Sòlids suspensió (mg/L)	Sòlids totals (mg/L)	Nitrogen orgànic (mg/L)	Nitrogen amoniacal (mg/L)	NaCl (mg/L)
Sala sacrifici	6,6	825	220	1840	134	6	435
Sang i aigua	9	32 000	3690	44 640	5400	205	6670
Sala especejament	7,4	520	610	2840	33	2,5	1620
Triperia	6	13 200	15 120	22 600	643	43	360
Sala procés carn	7,3	2040	1800	26 480	83	12	19 700
Rentat	7,3	1960	920	9560	109	17,5	6200
Greixos	7,3	180	180	820	84	25	230
Subproductes	6,7	2200	1380	4000	186	50	1330
Rentat	9,6	1300	4120	18 260	56	5	

El punt més contaminant en un escorxador està ubicat a la zona de sacrifici, on es genera el subproducte més problemàtic de la indústria càrnia, la sang, ja sigui per l'elevat volum produït o pel seu poder contaminant (Taula 1.3). Per tal de reduir la càrrega orgànica en els efluents dels escorxadors industrials, seria essencial recuperar-la. Els equips de depuració de les aigües residuals dels escorxadors es veuen molt perjudicats en el seu funcionament si el contingut total de sang es vessa directament a la depuradora, perjudicant en primer lloc a l'equip de depuració i també degradant la qualitat de les aigües residuals que es vessen al cabal públic o xarxa de clavegueram.

Taula 1.3. Potencial contaminant de la sang i Límits màxims establerts (Tritt i Schuchardt, 1992; Ruíz *et al.*, 1993)

Potencial contaminant de la sang	
Cabal aprox. escorxador porcí (L)	200-600
Matèria orgànica (DQO, mg/L)	1500-1600
Sòlids en suspensió (SST, mg/L)	300-11 000

Límits màxims establerts RD 849/1986	
Matèria orgànica (DQO, mg/L)	500
Sòlids en suspensió (SST, mg/L)	300

Un aspecte molt important per minimitzar aquesta contaminació és realitzar una bona recollida de la sang i evitar al màxim que aquesta vagi a parar a les aigües residuals. Normalment, entre un 15 i un 20 % de la sang acaba formant part del vessament final dels escorxadors (De las Fuentes *et al.*, 1998).

1.4. La sang de porc com a subproducte

La sang és una de les fonts de proteïna infrautilitzada més valuosa generada a la indústria càrnia i considerada fins fa poc temps com un residu. És un valuós subproducte degut al seu elevat contingut de proteïnes d'elevat valor biològic. En el cas concret de l'hemoglobina – present en els glòbuls vermells – el seu valor nutricional és degut també a l'elevat contingut en ferro hèmic, la forma fisiològica del ferro més fàcilment absorbible. A més, les proteïnes de la sang presenten propietats funcionals útils en la formulació d'aliments, de manera que poden tenir molts usos a la indústria alimentària. Això és el que ha motivat l'aparició de diversos mètodes relatius a la recuperació de la sang o de les seves fraccions i la seva posterior utilització. Una valorització eficaç de la sang exigeix la utilització de sistemes de recollida higiènica que redueixin els riscos de contaminació microbiològica i permetin elaborar productes amb un cert valor afegit, però també contribueixen a l'encariment del producte final.

Al nostre país hi ha només una empresa que es dedica a reciclar i valoritzar la sang procedent d'escorxadors anomenada APC Europe que treballa amb la participació de la Junta de Residus del Departament de Medi Ambient. Aquesta empresa gestiona la recollida, tractament i aprofitament de la sang procedent d'escorxadors de Catalunya i d'alguns de l'Estat Espanyol; n'obtenen farines, sang atomitzada, etc. que són aplicables a diversos camps com l'alimentació, la cosmètica i la dietètica, la farmacologia, la piscicultura o l'agricultura (Taula 1.4).

Taula 1.4. Utilitats industrials i aplicacions de la sang (Ockerman i Hansen, 1994)

Aplicació	Utilització
Alimentació humana	Agent emulsionant, estabilitzant, gelificant, clarificant, additiu de color, component nutricional, i substitut de la clara d'ou, elaboració de productes carnis reestructurats i surimi.
Alimentació animal	Suplement de lisina, estabilitzador de vitamines, substitut de la llet, component nutricional.
Fertilitzants	Revestiment de llavors, estabilitzant del pH del sòl, components minerals.
Laboratoris	Medis de cultiu, peptones, albúmines, globulines, esfingomielina, catalasa.
Medicina	Proves bioquímiques d'aglutinació, immunoglobulines, tècniques de fraccionament, factors de la coagulació, material de sutures quirúrgiques, fibrinogen, derivats de la fibrina, serotonina, plasminogen, additius del plasma.
Altres sectors	Adhesius, finalitzadors per al cuir i teixits, coadjuvants d'insecticides, extintors per a incendis, fabricació de ceràmica, plàstics i cosmètics.

1.4.1. Sistemes industrials de recollida de sang

Segons el sistema que s'apliqui durant el sacrifici per recollir la sang, aquesta es podrà classificar bàsicament en dos tipus, sang veterinària i sang higiènica (Rodríguez, 1994):

- **Sang veterinària (sistema obert):** Aquesta sang s'obté mitjançant el dessagnat normal amb un ganivet, fent un tall des del començament del tòrax fins a la unió amb el cap, tallant així les caròtides i la jugular. El segueix un període de dessagnat col·locant un recipient o un embut sota la pell de l'animal. Durant el procés d'extracció de la sang no es prenen mesures de seguretat higièniques i la sang arrossega tota mena de substàncies estranyes (saliva, excrements, aigües de rentat, etc.). La sang obtinguda per aquest sistema presenta una alta càrrega microbiològica contaminant (10^5 - 10^6 ufc·mL⁻¹), i només es podrà fer servir en l'elaboració de farines i pinsos per a alimentació animal.
- **Sang higiènica (sistema tancat):** Per a la obtenció d'aquesta sang s'utilitza un ganivet acanalat (Figura 1.3) per tal de fer l'extracció directament en la vena jugular o l'artèria aorta de l'animal. Aquest ganivet està connectat a un tanc refrigerat, de forma que la sang passa

directament del flux sanguini de l'animal al tanc on prèviament s'ha dipositat un anticoagulant, obtenint així una sang neta, sense contaminacions intermèdies i amb una càrrega microbiològica molt inferior que en el cas anterior ($<10 \text{ ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$). Això fa que aquesta sang sigui d'una qualitat molt superior i apta per al consum humà.

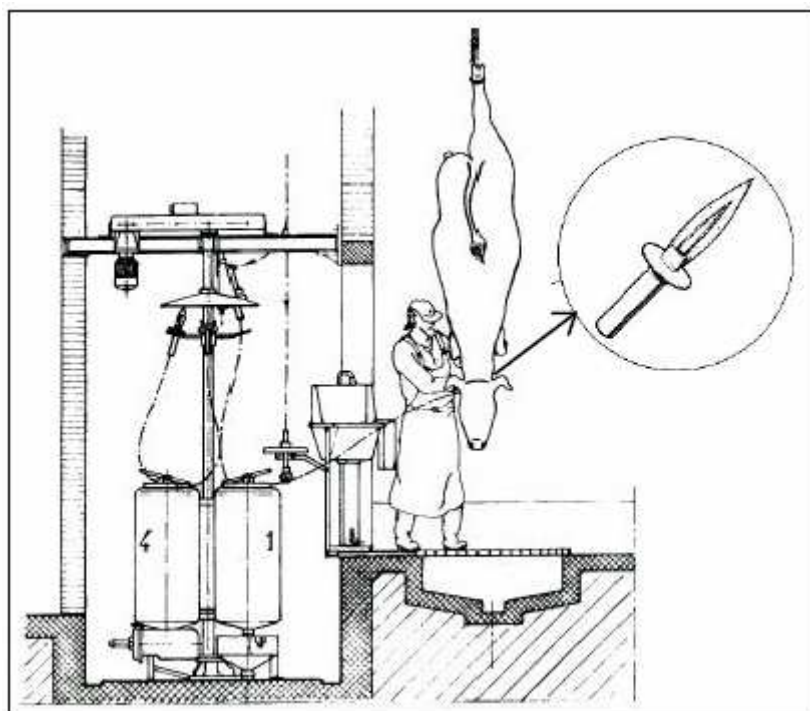


Figura 1.3. Sistema de recollida higiènica de la sang d'escorxador (Wisner-Pedersen, 1988) i detall del ganivet acanalat usat (Ockerman i Hansen, 1994)

Tanmateix, amb aquest sistema de recollida higiènica hi ha diversos inconvenients: alentiment de la velocitat del dessagnat i de la línia de sacrifici; augment de la probabilitat de malmetre l'espatlla de l'animal degut a les dimensions del ganivet sanitari; i que el dessagnat deficient pot reduir la vida mitjana de la carn fresca. Això ha fet que molts escorxadors hagin adoptat un **sistema obert modificat de recollida de sang** per tal de que aquest mètode s'apropi més al sistema higiènic i permeti l'ús de la sang en la indústria alimentària. Aquestes modificacions son: la desinfecció constant de la zona de sacrifici, de la zona del dessagnat i dels tancs d'emmagatzematge; l'addició de substàncies anticoagulants; el ràpid emmagatzematge de la sang en condicions de refrigeració; i el control del temps de residència en els tancs de refrigeració.

1.5. Les fraccions de la sang de porc

La sang és el medi a través del qual l'organisme realitza el transport de nutrients i metabòlits a totes les cèl·lules del cos. Realitza l'intercanvi d'oxigen i diòxid de carboni entre els pulmons i els teixits, transporta els nutrients procedents de l'aparell digestiu i productes del metabolisme, i contribueix a l'eliminació dels metabòlits. Bàsicament, la sang esta constituïda per aigua i proteïnes d'elevat valor biològic. Està integrada per una substància líquida fonamental, el plasma, i elements cel·lulars sanguinis lliures en suspensió que formen la fracció cel·lular.

Fora dels vasos sanguinis, la sang coagula en poc temps. Si es vol utilitzar industrialment s'ha d'evitar que coaguli addicionant substàncies anticoagulants com l'àcid cítric, el citrat sòdic o polifosfats. Així, la fracció cel·lular i el plasma sanguini es poden separar després mitjançant centrifugació, facilitant la seva valorització posterior. En absència d'anticoagulants, es pot deixar coagular la sang per obtenir el sèrum, que és l'equivalent al plasma, però sense la presència del fibrinogen i de precursors dels factors de coagulació (Figura 1.4).

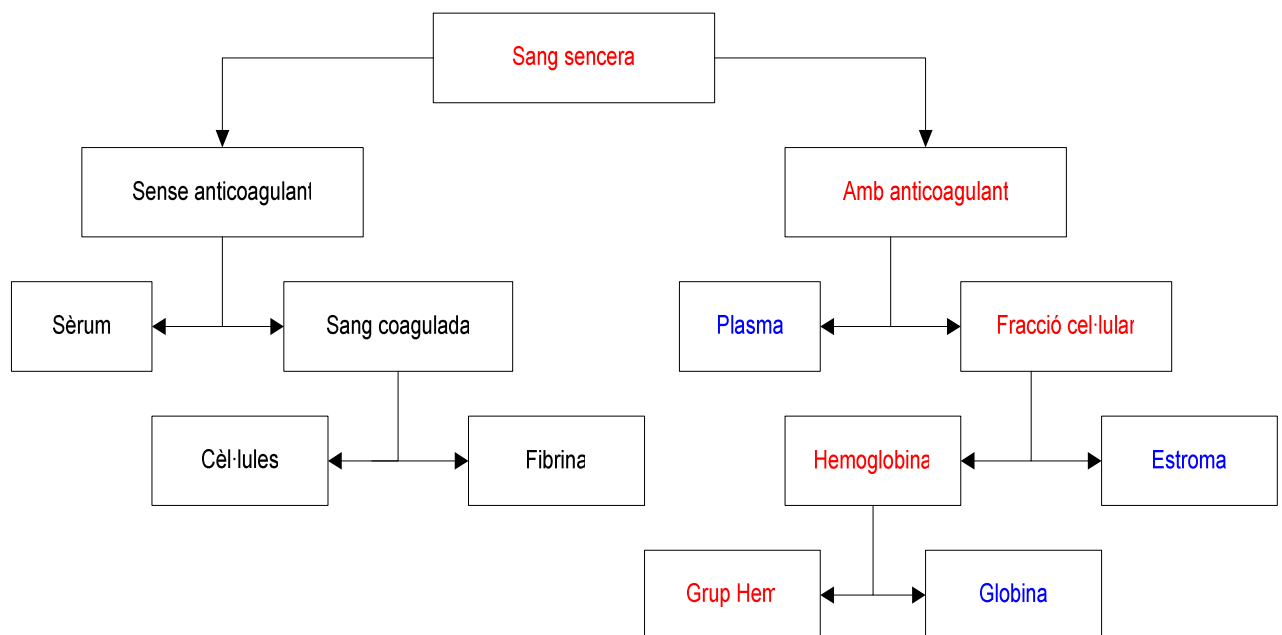


Figura 1.4. Esquema del fraccionament de la sang (Ranken, 1980)

Les dues fraccions de la sang separades per centrifugació en el cas d'afegir anticoagulant – plasma i fracció cel·lular – contenen proteïnes. En el plasma s'hi troben principalment seroalbúmina, globulines (fonamentalment immunoglobulines) i fibrinogen (en un 3,3 %, 4,2 % i 0,4 % del plasma, respectivament), mentre que la proteïna principal de la fracció cel·lular és l'hemoglobina dels glòbuls vermells (Taula 1.5).

Taula 1.5. Composició de les diferents fraccions de la sang ($\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) (Ranken, 1980, citat per Cheftel *et al.*, 1989)

Component	Sang sencera	Sèrum (66% de la sang)	Plasma (60% de la sang)	Fracció cel·lular (40% de la sang)
Aigua	80,8	91,2	90,8	60,8
Sals minerals	0,9	0,8	0,8	1,1
Greixos	0,2	0,1	0,1	0,4
Proteïnes:	17,0	7,5	7,9	35,1
Albúmina	2,2	3,3	3,3	-
Fibrinogen	0,3	-	0,4	-
Globulina	2,8	4,2	4,2	-
Estroma	1,7	-	-	5,1
Hemoglobina	10,0	-	-	30,0
Altres substàncies	1,1	0,4	0,4	2,6

Aquestes proteïnes es poden usar a la indústria degut a les seves bones propietats funcionals, les quals es poden definir com totes aquelles propietats no nutricionals que influeixen en la utilització d'un ingredient en un aliment (Cheftel *et al.*, 1989) i es poden classificar en diferents grups: propietats d'hidratació (solubilitat, capacitat de retenció d'aigua), propietats que depenen de les interaccions proteïna-proteïna (gelificació, formació de pastes proteiques), propietats de superfície (propietats escumants i emulsionants), propietats sensorials (color, flavor,...), i altres.

1.5.1. Plasma

El plasma sanguini representa aproximadament entre el 55 – 65 % del volum total de la sang. És un líquid compost principalment per aigua (entre un 90 i un 91 %), amb un 6 – 8 % de proteïnes d'elevat valor nutritiu. Les proteïnes del

plasma posseeixen la capacitat de formar gels per escalfament i disposen d'una excel·lent capacitat emulsionant i escumant. Encara que el mercat és ampli, bàsicament s'utilitza a la indústria càrnia com a enriquidor proteic i per afavorir el procés fermentatiu millorant les seves característiques organolèptiques. A més, les proteïnes plasmàtiques més importants, una vegada purificades es poden utilitzar en altres camps com el farmacèutic (Torres *et al.*, 1997).

1.5.2. Fracció cel·lular

La fracció cel·lular està formada principalment pels eritròcits (glòbuls vermells) i, en menor proporció, pels leucòcits (glòbuls blancs) i els trombòcits (plaquetes). Els glòbuls vermells són els responsables del transport dels gasos (oxigen i diòxid de carboni), tenen forma de disc bicòncav amb un diàmetre aproximat de 6 µm, no posseeixen nucli ni orgànuls i el seu citoplasma està ocupat quasi en la seva totalitat per l'hemoglobina. Els glòbuls blancs són els encarregats de destruir els agents infecciosos i les cèl·lules infectades, així com també de segregar substàncies protectores com els anticossos; són cèl·lules amb nucli i sense color, amb un diàmetre de 4 - 14 µm. Les plaquetes són petits fragments cel·lulars de 2 - 3 µm de diàmetre, ovalats i sense nucli, que intervenen en els fenòmens de la coagulació en lesions que poden afectar als vasos sanguinis.

La fracció cel·lular, una vegada separada del plasma, conté un 28 - 38 % de proteïna, de la qual el 90 - 91 % es troba en forma d'hemoglobina. Així doncs, l'hemoglobina és la proteïna més abundant de la sang, representant entre un 60 i un 70 % de la proteïna total de la sang sencera (Taula 1.6).

Taula 1.6. Composició química de la fracció cel·lular de la sang de porc (Gorbatov, 1988)

Components	g·100 g⁻¹ de fracció cel·lular
Aigua	62,56
Sòlids secs	37,44
Hemoglobina	32,68
Altres proteïnes	1,92
Sucre	-
Colesterol	0,049
Lecitina	0,346
Greix	-
Àcids grassos	0,006
Fòsfor als àcids nucleics	0,011
Sodi	-
Potassi	0,496
Òxid fèrric	0,159
Calci	-
Magnesi	0,015
Clor	0,147
Fòsfor total	0,206
Fòsfor inorgànic	0,165

(- : no determinat)

Malgrat les seves bones propietats nutricionals i funcionals, la fracció cel·lular dóna alguns problemes a l'hora d'utilitzar-la. La seva utilització a la indústria alimentària està molt limitada pel seu intens color vermell o fosc en la majoria de casos (quasi negre) per oxidació ja sigui en producte fresc o cuit. Per això, s'utilitza quasi exclusivament com a suplement proteic en la formulació de pinsos compostos per a alimentació animal, en la que l'hemoglobina es pot utilitzar per incrementar el valor nutritiu de les dietes de cria de bestiar, o per dietes especials en tractaments d'animals malalts (Rodríguez, 1994).

Per evitar l'aportació de coloracions no desitjades en utilitzar hemoglobina com a ingredient alimentari, s'han desenvolupat diverses tècniques de decoloració. Aquests procediments estan basats en la ruptura de la unió entre els dos components de l'hemoglobina, el grup hemo i la globina, mitjançant diferents tècniques d'hidròlisi (química o enzimàtica), o la utilització d'agents desnaturalitzants o adsorbents (Autio *et al.*, 1983; Corcuff *et al.*, 1985; Sato *et*

al., 1981; Toldrà, 2002; Yang *et al.*, 1998). De tota manera, hi ha molts països que, de forma tradicional, utilitzen la sang de forma directa en l'elaboració de productes alimentaris típics (botifarres negres, pastissos de sang, etc.).

D'altra banda, la fracció cel·lular es podria utilitzar com a colorant alimentari d'origen natural donat que aquesta és la coloració de la proteïna més abundant de la sang, l'hemoglobina. Aquesta possibilitat és interessant en aquells països en els que no estan permesos els colorants vermells artificials. Tanmateix, perquè això sigui possible cal estabilitzar el seu color, el qual és molt susceptible a fenòmens d'oxidació.

1.5.2.1. Hemoglobina

L'hemoglobina és una macromolècula formada per 4 cadenes polipeptídiques o globines (Figura 1.5). Cada polipèptid conté un grup prostètic, el grup hemo, localitzat en una espècie de butxaca rica en residus apolars i unit a la part proteica.

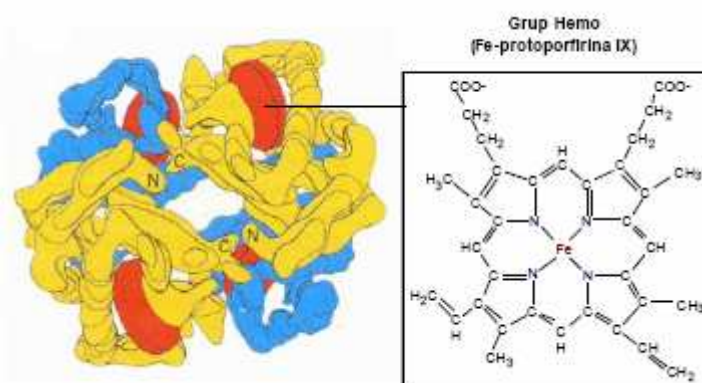


Figura 1.5. Molècula d'hemoglobina, indicant les cadenes α en groc, les cadenes β en blau, i els grups hemo associats a la molècula en vermell, i detall de l'estructura del grup hemo (Stryer, 1995)

L'hemoglobina està formada per 2 cadenes polipeptídiques α i 2 cadenes β , disposades de forma esfèrica en l'espai i associades entre elles per interaccions no covalents. El grup hemo és una molècula macrocíclica anomenada protoporfirina formada per quatre grups pirròlics heterocíclics lligats

per formar un anell tetrapirròlic al centre del qual hi ha un àtom de ferro (Figura 1.6).

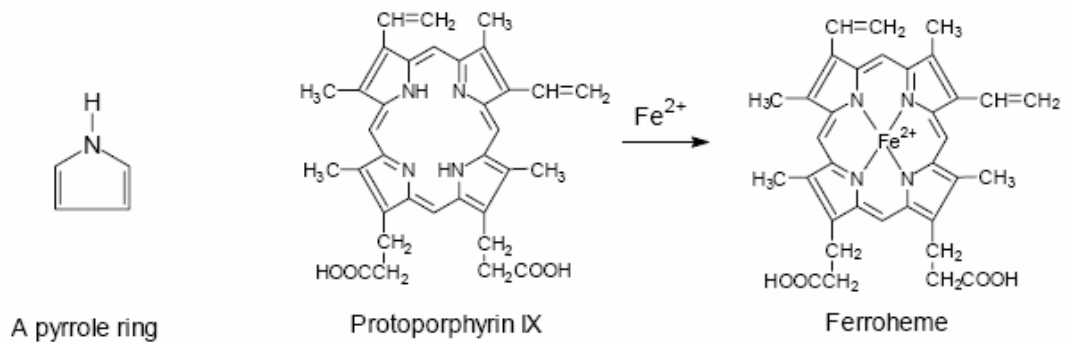


Figura 1.6. Estructura de l'anell pirròlic, la protoporfirina i el grup prostètic hemo (Dickerson *et al.*, 1983)

L'hemoglobina és una proteïna rica en aminoàcids essencials encara que, com es pot veure a la Taula 1.7., tant l'hemoglobina com la globina mostren un contingut deficient en isoleucina i pobre en metionina per les necessitats humanes requerides (FAO, 1973). Pel que fa al contingut dels altres aminoàcids presents, es consideren en una proporció suficient per aconseguir les necessitats suggerides per la FAO (Torres *et al.*, 1997). Degut a aquest dèficit s'aconsella l'ús de la sang com a complement dietètic per augmentar el valor nutritiu d'altres productes com els fabricats a partir de cereals (deficitaris en lisina) (Young *et al.*, 1973). A més de la seva utilització en la formulació de productes carnis, el grup hemo pot ajudar a pal·liar algunes patologies lligades a la deficiència en ferro com a producte farmacèutic per pacients amb anèmia, amb l'avantatge que aquest s'absorbeix de dues a tres vegades més que el ferro lliure (Rodríguez, 1994).

Taula 1.7. Composició en aminoàcids essencials de l'hemoglobina i la globina, calculades mitjançant diversos mètodes ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) (Wismer-Pedersen, 1988)

Composició en aminoàcids essencials de l'hemoglobina i la globina						
Aminoàcids	Hemoglobina	Globina ^a	Globina ^b	Globina ^c	Necessitats humanes ^d	
					Nens	Adults
Isoleucina	0,58	0,33	0,17	0,44	3,7	1,8
Leucina	13,36	11,40	13,3	13,78	5,6	2,5
Lisina	8,26	6,85	8,2	8,94	7,5	2,2
Metionina	0,92	0,76	1,4	0,76	-	-
Fenilalanina	6,49	5,77	5,4	6,79	3,4	2,5
Treonina	3,15	2,43	5,4	3,00	4,4	1,3
Triptòfan	1,90	1,60	-	0,90	0,5	0,7
Valina	8,82	6,94	8,7	10,24	4,1	1,8

(a) Kuppelvelt *et al.*, 1976; (b) Sato *et al.*, 1981; (c) Wismer-Pedersen, 1987; (d) FAO, 1973. (-) : no determinat.

El ferro pot estar en estat d'oxidació ferrós (Fe^{2+}) o fèrric (Fe^{3+}). Les diferents formes de l'hemoglobina s'anomenen ferrohemoglobina (Fe^{2+}) i metahemoglobina (Fe^{3+}). Només la ferrohemoglobina pot captar oxigen (Stryer, 1995). D'altra banda, és important indicar que el color de la molècula d'hemoglobina depèn de l'estat d'oxidació/oxigenació del ferro hèmic.

1.5.2.2. El color de l'hemoglobina

El grup hemo és el que dóna el color vermell a l'hemoglobina i, segons l'estat d'oxidació de l'àtom de ferro que conté, aquest color pot variar des del porpra de la ferrohemoglobina al marró de la metahemoglobina (Figura 1.7). Si la ferrohemoglobina lliga una molècula d'oxigen té un color vermell brillant.

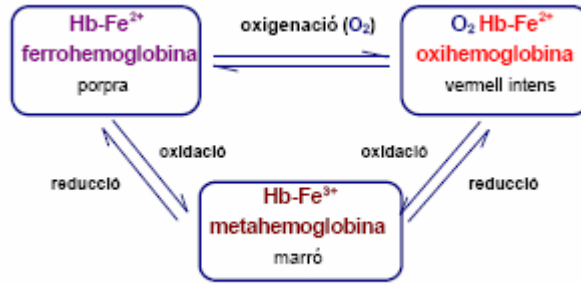


Figura 1.7. Formes de l'hemoglobina en funció de l'estat d'oxidació del grup hemo i de la concentració d'oxigen (Francis, 1993)

Degut a la funció de l'hemoglobina en l'organisme, quan el ferro està en la seva forma reduïda (Fe^{2+}) pot lligar l' O_2 per transportar-lo dels pulmons als teixits. Aquesta forma oxigenada de l'hemoglobina s'anomena oxihemoglobina ($\text{O}_2\text{Hb-Fe}^{2+}$) però quan allibera l' O_2 passa a desoxihemoglobina. Això explica per què la sang de les artèries és d'un color vermell més brillant que el de les venes.

És el pH del medi el que altera l'afinitat de l'hemoglobina per l' O_2 . En els pulmons, el pH és més alcalí, i l'hemoglobina lliga l' O_2 i el transporta fins als capil·lars on el pH és més àcid (degut al CO_2 i l'àcid làctic que hi ha dissolts). Els protons H^+ addicionals es lliguen a l'hemoglobina, canvien la seva forma, i fan que alliberi el seu oxigen. Llavors l'hemoglobina s'uneix al CO_2 i el transporta de tornada als pulmons per expulsar-lo. Només un petit canvi en el pH (7,6 en els pulmons *versus* 7,2 en els teixits) té com a resultat aquesta conducta (Dickerson i Geis, 1983).

1.6. Propietats funcionals de la fracció cel·lular

Se sap que l'hemoglobina és una proteïna altament soluble i amb una gran capacitat per formar emulsions i produir escumes estables (Buchbjerg, 1977). La globina aïllada, però, és molt menys resistent als agents desnaturitzants que l'hemoglobina i es desnatura amb els dissolvents orgànics i a valors de pH àcid durant els procediments de decoloració (Antonini *et al.*, 1971).

Una de les aplicacions més interessants de l'hemoglobina és el seu ús potencial com a colorant vermell d'origen natural. Tanmateix, la deshidratació per atomització – el principal mètode de conservació aplicat a la fracció cel·lular – provoca un enfosquiment degut a l'oxidació del ferro del grup hemo.

1.7. Sistemes de conservació de la sang i les seves fraccions

La sang i, en especial, la fracció cel·lular com a subproductes industrials, hauran de ser sotmesos a un tractament de conservació senzill, de fàcil aplicació i que sigui econòmicament viable. Degut a la seva composició (rics en nutrients i amb una elevada a_w), aquests productes són un medi òptim per al creixement de microorganismes. Així doncs, el sistema de conservació ha de garantir, des del punt de vista higienico-sanitari, que aquest producte mantindrà la seva qualitat nutritiva, organolèptica i funcional durant el seu emmagatzematge.

Per tal de conservar de manera eficient la fracció cel·lular cal disminuir la seva a_w . Aquesta reducció implica una disminució dels efectes negatius de microorganismes, enzims o reaccions autoxidatives sobre el producte. Els sistemes de conservació de la fracció cel·lular més usats són la congelació i la deshidratació (Ockerman i Hansen, 1994). Els dos sistemes permeten reduir notablement l' a_w . Malgrat la seva eficàcia, tenen alguns inconvenients: en la congelació el volum de producte emmagatzemat és molt gran i, per tant, caldrà una despesa energètica important. La deshidratació evita els inconvenients de la congelació, donat que els aliments deshidratats es poden conservar a temperatura ambient i ocupen molt poc espai (comportant una disminució en despeses d'emmagatzematge i distribució). Tanmateix, depenent del sistema de deshidratació que s'utilitzi, s'obté un producte final amb unes propietats funcionals, organolèptiques i nutricionals més o menys alterades.

Els mètodes emprats per a la deshidratació d'aliments poden classificar-se de la següent manera (Brennan *et al.*, 1980): dessecació per aire calent, on la calor que s'aporta a l'aliment és principalment per convecció mitjançant un

corrent d'aire calent; dessecació per contacte directe amb una superfície calenta, aportant la calor per conducció; dessecació mitjançant l'aportació d'energia electromagnètica; i la liofilització, que es basa en la congelació de l'aigua del producte per després sublimar-la a vapor on, generalment, l'aportació de calor es fa en condicions de pressió molt baixa. Aquest últim sistema, però, suposa un elevat consum energètic, és a dir, una despesa molt elevada de manera que només s'utilitza per productes d'elevat valor afegit. A més, malgrat que en principi es tracta d'un procediment excel·lent per assegurar les màximes condicions de molts aliments (Mafart, 1994), en el cas de l'hemoglobina s'ha vist que durant l'establiment de les condicions de buit requerides per a la liofilització s'afavoreix molt l'oxidació del ferro hèmic (Saguer, comunicació personal).

De tots aquests sistemes, el que més s'ajusta a les exigències de l'hemoglobina és la deshidratació per atomització. Aquest sistema es basa en polvoritzar el producte en fines gotes, alhora que es posen en contacte amb un corrent d'aire calent que actua com a fluid calefactor i vehiculador. L'elevada temperatura i la gran superfície de transferència de calor fa que les gotes polvoritzades cedixin la seva humitat deshidratant-se ràpidament. Aquesta ràpida dessecació del producte no deixa que assoleixi temperatures gaire elevades – que malmetrien excessivament les seves característiques – donant un producte de bona qualitat. Però, tot i això, l'aplicació d'aquesta tècnica comporta un enfosquiment de l'hemoglobina degut a l'oxidació del ferro del grup hemo. Segurament, en l'hemoglobina en pols, la seva forma oxidada, metahemoglobina, es la que es troba en una major proporció donat que l'aire calent aplicat durant la deshidratació per atomització produeix una acceleració de l'oxidació del ferro del grup hemo conferint-li aquest color marró fosc (Toldrà *et al.*, 2002).

Per tal d'estabilitzar el color durant la deshidratació de l'hemoglobina i el seu posterior emmagatzematge, es proposa l'ús d'additius antioxidants i/o agents quelants del ferro els quals poden minimitzar els fenòmens d'oxidació (Toldrà *et al.*, 2000; Saguer *et al.*, 2003). Els agents antioxidants usats en la indústria alimentària són substàncies que s'afegeixen als aliments i begudes amb

l'objectiu d'inhibir les reaccions d'oxidació impedit el seu mecanisme d'acció. Diferents agents antioxidants mostren diferents graus d'eficiència en la protecció d'un aliment, essent les combinacions d'aquests les que solen proporcionar una protecció més completa que la que poden aportar els additius per separat (Belitz i Grosch, 1999). D'altra banda, les substàncies quelants o segrestants, tot i que no impedeixen l'oxidació actuant com a consumidors d'oxigen, es comporten com a valuosos antioxidants perquè segresten els ions metàl·lics que catalitzen el procés d'oxidació. El seu mecanisme d'acció consisteix en reaccionar amb aquests ions per formar complexos més estables que alterin les seves propietats i els seus efectes sobre els aliments. En el nostre cas, es poden unir al ferro del grup hemo formant complexos i evitant reaccions que condueixin a canvis de coloració del producte (Fennema, 1993).

Tenint en compte que el grup hemo de l'hemoglobina també té una gran afinitat pel monòxid de carboni (CO) (Stryer, 1995), una altra possible solució per resoldre el problema de la coloració de la sang és modificar l'hemoglobina i transformar-la en una molècula més estable, com la carboxihemoglobina. Ocak *et al.* (1985) i Fontes *et al.* (2004) han treballat en l'estabilització del color en la sang líquida saturant-la amb CO. Aquests autors han obtingut bons resultats però s'haurien d'estudiar les implicacions toxicològiques d'aquesta sang tractada amb CO.

1.8. Objectius del treball

Els objectius concrets d'aquest estudi són:

- a) Determinar els efectes de l'addició conjunta d'agents quelants (àcid nicotínic o nicotinamida) i un agent reductor (glucosa) al concentrat d'hemoglobina de porc sobre l'enfosquiment oxidatiu que es produeix durant la seva deshidratació per atomització.

- b) Determinar si els efectes, en cas de que siguin beneficiosos, es mantenen durant el període d'emmagatzematge del concentrat d'hemoglobina deshidratat.

Per dur a terme aquests objectius es determinaran els percentatges relatius dels derivats de l'hemoglobina i el color tant abans com just després de la deshidratació per atomització així com l'evolució del color de la pols obtinguda durant el seu emmagatzematge.

Tanmateix, és important indicar que la formulació dels objectius és posterior a l'etapa en la que s'hauran assajat tota una sèrie de compostos diferents (afegits a diferents concentracions) sols i en combinació, per tal d'escollir aquells que puguin ser considerats com a bons candidats per a l'estabilització del color de l'hemoglobina.

2. MATERIAL I MÈTODES

Els experiments duts a terme en aquest estudi per tal d'estabilitzar el color de l'hemoglobina provinent de sang de porc tant durant la deshidratació per atomització com durant el període d'emmagatzematge es poden separar en dues etapes: una primera etapa, en la que es varen anar assajant diferents compostos (àcid nicotínic, nicotinamida, àcid ascòrbic, glucosa i sacarosa) individualment i en combinació, modificant en alguns casos la concentració, per tal d'esbrinar el seu potencial com a protectors del color de l'hemoglobina; i una segona etapa, en la que aquells compostos o combinacions que s'havien mostrat com a bons candidats es varen assajar seguint un disseny experimental que permetés el tractament estadístic de les dades. Diferents cases comercials van subministrar els agents assajats: àcid nicotínic (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemanya), nicotinamida (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Alemanya), D-(+)-glucosa PRS-CODEX (Panreac Química, S.A., Montcada i Reixach, Barcelona), àcid L-ascòrbic (E-330) (SBI Systems BIO-industries S.A., Rubí, Barcelona) i sacarosa PRS ref. 141621 (Panreac Química, S.A., Castellar del Vallès, Barcelona).

2.1. Disseny experimental

2.1.1. Proves preliminars

Els compostos inicialment considerats varen ser l'àcid nicotínic (AN) i la nicotinamida (Nam) com a agents quelants, a una concentració del 2 % i 2,5 % (p/v), respectivament, dels quals ja s'havia demostrat en un estudi previ el seu efecte protector (Saguer *et al.*, 2003). També es va considerar l'àcid ascòrbic (AA) el qual, si bé no havia mostrat un efecte estabilitzador del color de l'hemoglobina de porc massa important quan es va assajar individualment (Toldrà, 2002), es va pensar que potser en combinació amb algun altre compost es podria posar de manifest de manera més evident la seva activitat antioxidant. Finalment, degut al poder reductor d'alguns sucres, al seu efecte estabilitzador sobre l'estructura de les proteïnes i a la menor eliminació d'aigua

durant la deshidratació que comporta la seva presència (Labrude *et al.*, 1987), es va optar per assajar tant amb glucosa com amb sacarosa. El caràcter reductor de la glucosa, a diferència de la sacarosa, tot i que en principi podria ser un aspecte interessant, també podria tenir efectes negatius sobre el color degut a la seva participació en reaccions de Maillard. L'ordre de les proves preliminars es mostra a la Figura 2.1.

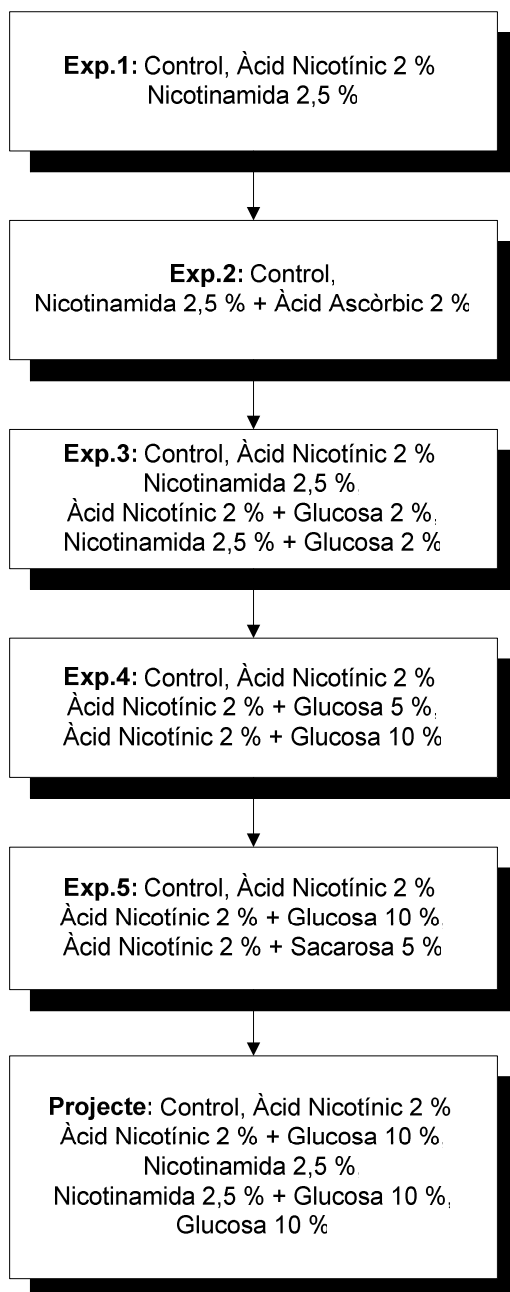


Figura 2.1. Diagrama de flux de les proves preliminars

Cada experiment es va dur a terme sobre el concentrat d'hemoglobina (CHb) obtingut a partir de la fracció cel·lular d'una mostra de sang de porc diferent i es determinaven els percentatges dels diferents derivats d'hemoglobina i/o els paràmetres del color de la pols obtinguda just després de la deshidratació per atomització així com durant el període d'emmagatzematge (1 mes a temperatura ambient).

2.1.2. Assaig final

En l'etapa de proves preliminars es va obtenir que la combinació d'àcid nicotínic (2 % p/v) amb la glucosa (10 % p/v) comportava una millora substancial en l'estabilització del color del concentrat d'hemoglobina durant la seva deshidratació per atomització així com un alentiment en la seva oxidació durant el període d'emmagatzematge, respecte al tractament només amb àcid nicotínic. Tanmateix, en aquesta segona part del treball també es varen tenir en compte els resultats obtinguts en l'estudi realitzat per Sagner *et al.* (2003), els quals mostraven que, tot i que l'àcid nicotínic permetia obtenir una pols més vermella i clara que la nicotinamida (2,5 % p/v) després del tractament de deshidratació, l'efecte d'aquesta darrera era més estable a pH àcid.

És per això que en aquesta segona part de l'estudi es va decidir comparar els efectes d'un agent quelant (àcid nicotínic o nicotinamida, a la concentració prèviament establerta) sol i en combinació amb glucosa (10 % p/v) així com d'aquesta darrera sola a la mateixa concentració sobre 3 concentrats d'hemoglobina obtinguts a partir de 3 mostres diferents de sang de porc. Així, cadascun d'ells es va dividir en 6 alíquotes per tal d'aplicar cinc tractaments diferents (amb àcid nicotínic al 2 %; amb nicotinamida al 2,5 %; amb glucosa al 10 %; amb àcid nicotínic al 2 % i glucosa al 10 %; i amb nicotinamida al 2,5 % i glucosa al 10 %) i mantenir-ne una sisena com a control. Cadascuna d'elles s'ajustava al pH natural del concentrat d'hemoglobina control (pH 7,4) i, posteriorment, es deshidratava per atomització.

Una vegada obtingudes les diferents mostres de concentrat d'hemoglobina en pols, aquestes es sotmetien a un seguiment dels percentatges de cadascun dels tipus d'hemoglobina així com a l'evolució dels paràmetres de color CIE L*, a* i b*. En ambdós casos les mesures es varen fer durant un període d'un mes, amb més freqüència durant la primera setmana per, posteriorment, prendre mesures setmanalment.

2.2. Obtenció de les mostres de sang

Les mostres de sang de porc fresca (aproximadament 5 L) provenien d'un escorxador industrial de la comarca del Gironès, la qual s'obtenia aplicant un sistema obert modificat de recollida per dessagnat vertical. Les mostres es recollien en recipients estèrils que contenien citrat de sodi com anticoagulant (concentració final en sang de l'1 % p/v) i es transportava fins al laboratori en un temps màxim de mitja hora utilitzant una bossa amb aïllants tèrmics per tal de mantenir-la en condicions de fred durant aquest període. Al laboratori, la sang es conservava també en refrigeració fins al seu processament per evitar el seu deteriorament.

2.3. Obtenció del concentrat d'hemoglobina

A la Figura 2.2. es mostra el diagrama de flux que es va seguir per a l'obtenció dels concentrats d'hemoglobina (CHb) deshidratats per atomització, tant control com tractats amb diferents agents per estabilitzar el seu color.

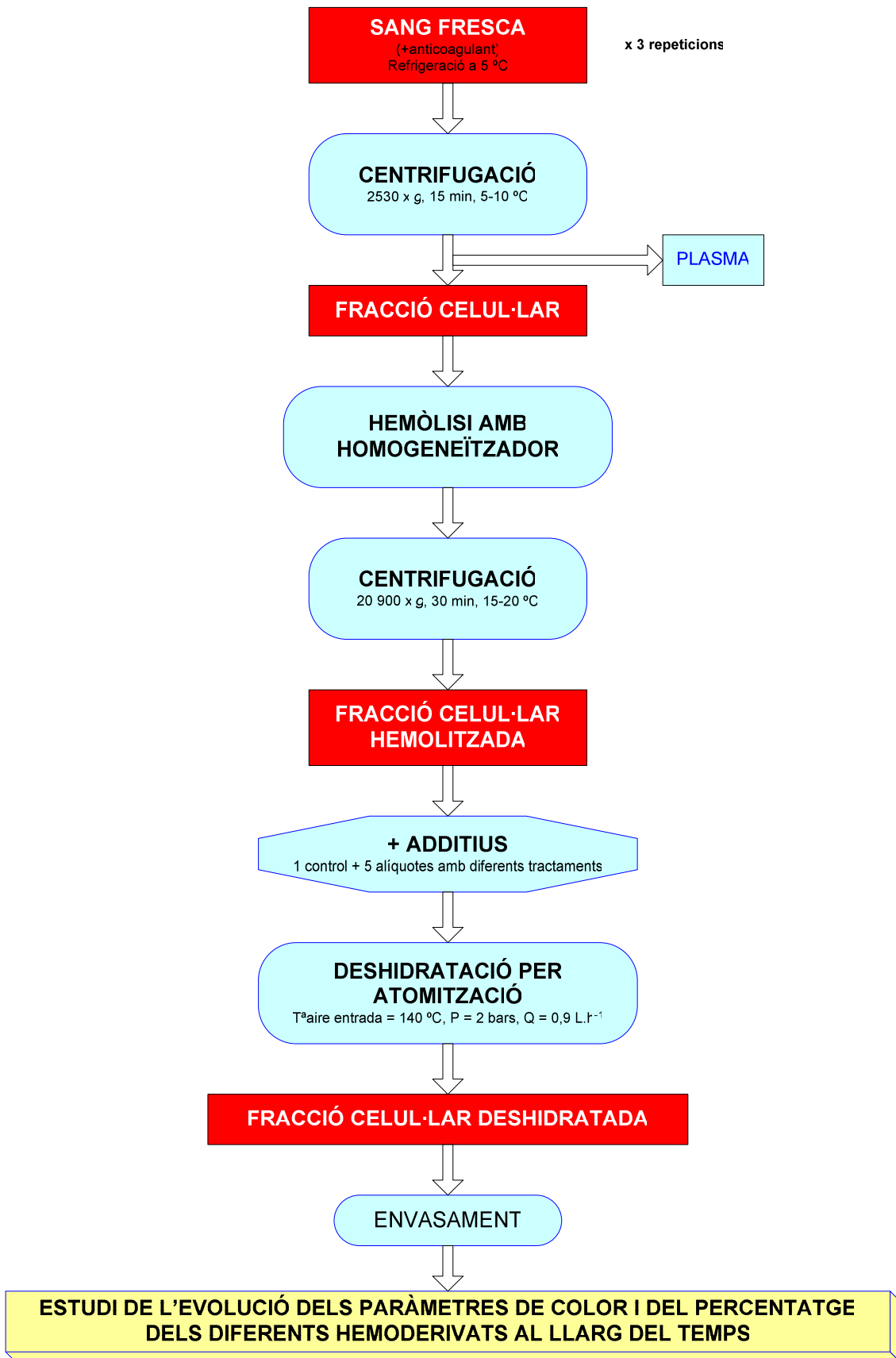


Figura 2.2. Diagrama de flux per a l'obtenció del CHb deshidratat per atomització

2.3.1. Obtenció de la fracció cel·lular per centrifugació

Les mostres de sang es van centrifugar a 2528 x g durant 15 min a una temperatura d'entre 5 i 10 °C amb una centrifuga Sorvall 500 RC Plus amb un rotor SLA-1500 (Dupont, Newtown, U.S.A.). Una vegada centrifugades, es separava immediatament la fracció plasmàtica per decantació, obtenint la fracció cel·lular.

2.3.2. Hemòlisi de la fracció cel·lular

Per poder extreure l'hemoglobina continguda en els eritròcits de la fracció cel·lular, aquesta es va fer passar per un homogeneïtzador d'alta pressió escala laboratori model FPG 7400 (Stansted Fluid Power Ltd. Stansted, England) en les següents condicions: pressió d'entrada, 5 bars; pressió de processat, 10 MPa; i temperatures d'entrada i de sortida, 15 i 25 °C, respectivament. L'homogeneïtzador d'alta pressió (Figura 2.3.) consta d'una bomba de desplaçament positiu i una vàlvula amb ressort. Es fa passar la mostra a alta pressió a través de l'obertura de la vàlvula i es produeix el trencament de les cèl·lules mitjançant una combinació del flux turbulent i la força de cisalla.

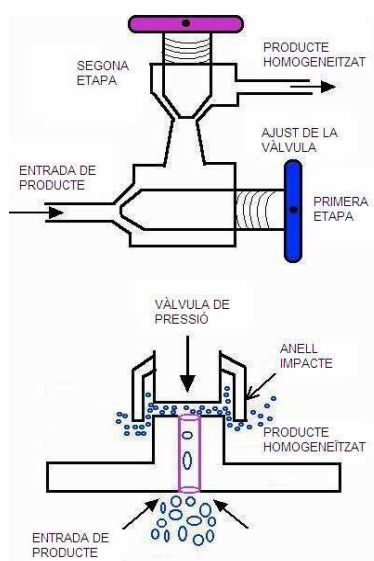


Figura 2.3. Esquema d'un homogeneïtzador d'alta pressió (<http://br.geocities.com/abgalimtec>)

Posteriorment, es centrifugava la fracció cel·lular hemolitzada a una velocitat de 20 900 x g, durant 30 min, a una temperatura d'entre 15 i 20 °C per eliminar les restes d'estroma, i es separava del concentrat d'hemoglobina per decantació.

2.3.3. Addició d'agents per a l'estabilització del color

Una vegada obtingut el concentrat d'hemoglobina, es dividia en diferents al·lquotes per assajar els tractaments amb les substàncies escollides (soles o en combinació). L'addició d'aquestes substàncies es feia lentament, amb agitació constant per facilitar la seva dissolució i mantenint el seu pH sempre superior a 6,5 mitjançant l'addició de NaOH 0,5 N per tal d'evitar el deteriorament del color que es dona a pH baixos.

2.3.4. Deshidratació per atomització

Els concentrats d'hemoglobina (tant control com tractats) es van deshidratar per atomització en un deshidratador de laboratori Spray Dryer SD-05 (Lab-Plant Ltd. Huddersfield, UK) (Figura 2.4).

Les condicions utilitzades, les quals es mostren a continuació, van ser les establertes per Toldrà (1998):

- Temperatura de deshidratació: 140 °C
- Temperatura màxima de sortida: 80 °C
- Cabal de la bomba d'alimentació: 900 mL·h⁻¹
- Cabal de l'aire d'entrada a la cambra de deshidratació: 64 m³·h⁻¹
- Pressió de l'aire en el compressor: 2 bars

Els concentrats d'hemoglobina deshidratats es van envasar en recipients estèrils de plàstic i es van emmagatzemar en condicions de foscor al laboratori a temperatura ambient.

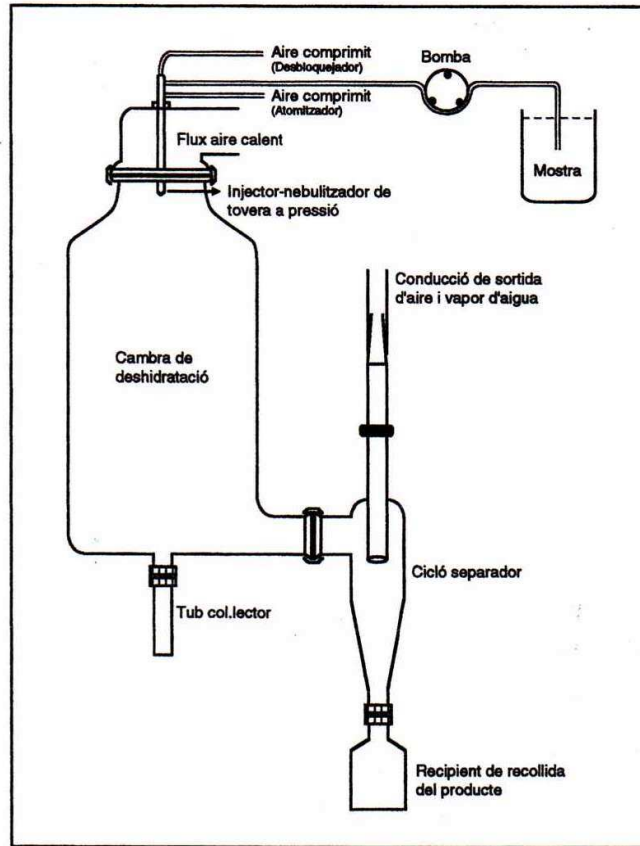


Figura 2.4. Esquema de la instal·lació de deshidratació per atomització Lab-Plant Spray dryer SD-05 (Font: Parés, 1998)

2.4. Mesura dels paràmetres de color

Les propietats que defineixen el color són el to (color predominant que es percep de la llum reflectida); saturació o cromacitat (intensitat en que predomina aquest color o el grau en que aquest color es separa del gris neutre i s'acosta a un color pur de l'espectre); i lluminositat (quantitat de llum que es percep o la quantitat de blanc o negre que té el color; defineix si el color és clar o fosc, en una escala que té com a límits el blanc i el negre).

Per a la determinació del color, es va utilitzar un dels sistemes proposats per la "Commission Internationale de l'Eclairage" (CIE). Al 1931, aquesta comissió va definir un sistema no lineal (Yxy) a partir dels valors triestímul x (vermell), y (verd) i z (blau). Aquest model de color CIE va ser transformat matemàticament

al 1976 per obtenir un model colorimètric uniforme anomenat CIELAB, en el qual les distàncies entre els colors s'acosten més al que percebem (Figura 2.5).

L'espai CIELAB permet especificar els estímuls de color en un espai tridimensional on l'eix vertical L^* és la lluminositat i tots els colors amb la mateixa lluminositat es troben en un pla circular, a través del qual es creuen els eixos a^* i b^* (Figura 2.5). Els valors a^* positius són vermellorsos; els valors a^* negatius, verdosos; els valors b^* positius, groguencs; i els valors b^* negatius, blavosos. La lluminositat varia en la direcció vertical i va de 0 (negre) a 100 (blanc).

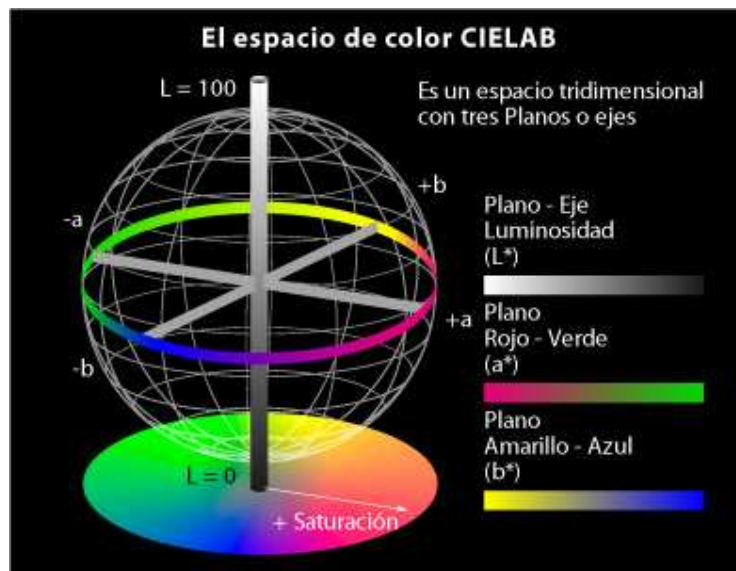


Figura 2.5. Espai tridimensional de color CIELAB (Westland, 2001)

Els tres paràmetres que descriuen el color (to, lluminositat i saturació), es troben representats en aquest model tridimensional. El to es troba a la part externa, al voltant de l'eix central, i la lluminositat i la saturació són els eixos vertical i horitzontal, respectivament (Figura 2.6).

Segons aquest mètode tridimensional i mitjançant tècniques instrumentals podem obtenir els tres paràmetres del color L^* , a^* i b^* i a partir d'aquests

determinar una quarta magnitud, la saturació [$C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$] (Clydesdale, 1984; Guzman *et al.*, 1995).

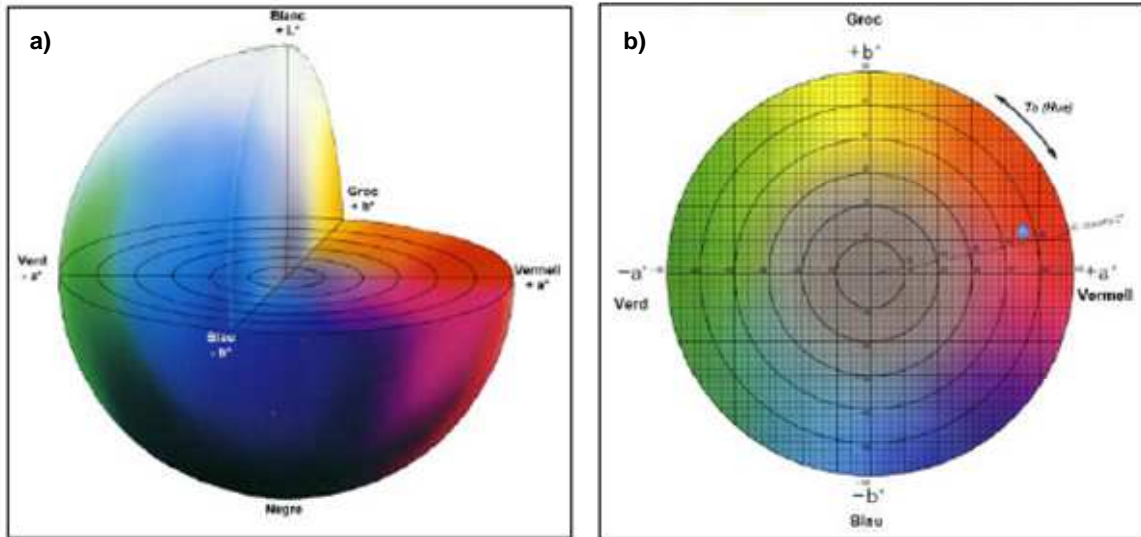


Figura 2.6. a) Representació tridimensional del sòlid de color corresponent a l'espai de CIELAB. b) Visió d'un tall horitzontal del sòlid de color a un valor de L^* constant. (Font: Minolta Co., 1994)

Per a la determinació de les coordenades L^* , a^* i b^* es va utilitzar un colorímetre CR-300 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japó) amb un con de projecció de vidre dissenyat per adaptar el capçal de mesura a productes en pols o particulats. Les mesures es van dur a terme a temperatura ambient i es va utilitzar l'il·luminant universal estàndard D_{65} (corresponent a la llum diürna i que inclou la regió ultraviolada de la longitud d'ona) i un observador estàndard de 2° . Cada determinació es va realitzar per triplicat. El colorímetre es va calibrar mitjançant una placa de referència corresponent al blanc.

2.5. Determinació de les diferents formes d'hemoglobina

La determinació dels percentatges de cadascun dels tipus d'hemoglobina (ferrohemoglobina lligada o LHb; ferrohemoglobina no lligada o Hb; i metahemoglobina o metHb) es va fer mitjançant el mètode espectrofotomètric proposat per Benesch *et al.* (1973). Les molècules d'hemoglobina són

colorejades i fàcilment mesurades en la regió del visible (Figura 2.7). L'estructura molecular de la meitat hemo en els diferents derivats de l'hemoglobina provoca un espectre d'absorbància característic a partir del qual és possible quantificar la concentració de cada derivat d'hemoglobina present en la barreja, ja que aquests mètodes d'anàlisi espectrofotomètrics estan basats en el principi que la llum absorbida és proporcional a la concentració del solut.

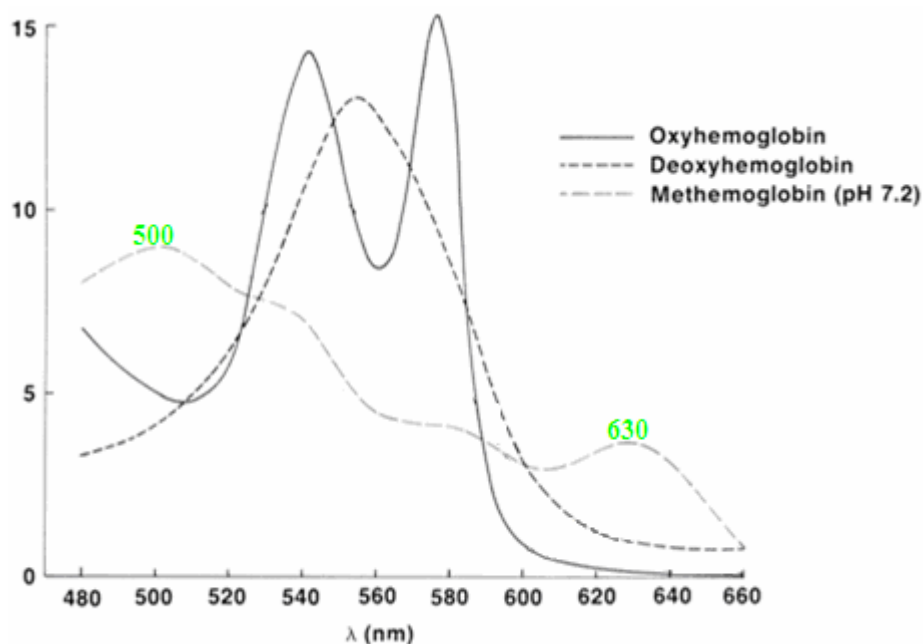


Figura 2.7. Espectre d'absorció en el rang del visible de les diferents formes de l'hemoglobina. (Font: modificat de http://www.bioc.rice.edu/bios532/UVvis/UVvis_files/UVvis.ppt#20)

Per fer-ho, es van preparar solucions a una concentració de 1:200 (p/v) amb aigua destil·lada, es va mesurar el pH i, posteriorment, l'absorbància amb un espectrofotòmetre PerkinElmer LAMBDA Bio 20 UV/Vis (PerkinElmer Life And Analytical Sciences Inc., Waltham, MA, USA) a 541, 560 i 576 nm utilitzant cubetes de vidre. Els càlculs del percentatge relatiu de cadascun dels derivats de l'hemoglobina es va fer a partir de les formules proposades per Benesch *et al.* (1973):

$$\text{LHb (\%)} = (1.4747 \cdot \text{Abs}_{576} - 0.6820 \cdot \text{Abs}_{560} - 0.5329 \cdot \text{Abs}_{541}) \cdot 10^{-4}$$

$$\text{Hb (\%)} = (1.4749 \cdot \text{Abs}_{560} + 0.2141 \cdot \text{Abs}_{576} - 1.1042 \cdot \text{Abs}_{541}) \cdot 10^{-4}$$

$$\text{metHb (\%)} = (4.5852 \cdot \text{Abs}_{541} - 0.8375 \cdot \text{Abs}_{560} - 3.7919 \cdot \text{Abs}_{576}) \cdot 10^{-4}$$

Les determinacions es van fer diàriament durant els primers quatre dies, per després fer-ho setmanalment fins complir un mes d'assaig.

2.6. Tractament estadístic de les dades

En l'assaig dut a terme amb significació estadística, els diferents dies de mostreig es varen considerar com a blocs en un disseny en blocs complets a l'atzar, en el qual els tractaments aplicats constituïen el factor principal tant en el cas d'avaluar els seus efectes sobre els percentatges dels diferents hemoderivats com els paràmetres de colors del concentrat d'hemoglobina en pols. Les anàlisis estadístiques es varen dur a terme amb el paquet estadístic SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Les dades corresponents als hemoderivats es varen sotmetre a una ANOVA utilitzant Proc GLM i, si s'obtenia un efecte significatiu, s'aplicava el test de Tukey per a la separació de mitjanes. Les dades de color es sotmetien també a una ANOVA però, per tal d'estudiar els canvis en aquests paràmetres durant el període d'emmagatzematge, es va aplicar també una ANOVA amb mesures repetides. Es va utilitzar el test de Mauchly per provar l'assumpció d'esfericitat, ajustant els graus de llibertat amb la correcció de Greenhouse-Geisser quan no es complia l'assumpció. En aquest disseny, els factors entre-subjectes eren Tractament (fix) i mostra (a l'atzar) mentre que el factor temps era el factor intra-subjectes. El nivell de significació va ser en qualsevol cas $\alpha = 0.05$.

3. RESULTATS

3.1. Proves preliminars

En aquesta primera etapa de l'estudi sobre l'estabilització del color de l'hemoglobina de porc, tant durant la deshidratació del concentrat d'hemoglobina (CHb) com durant el període d'emmagatzematge de la pols obtinguda, es van dur a terme una sèrie de proves amb diverses substàncies amb propietats quelants o bé antioxidants. Inicialment, es van assajar l'àcid nicotínic (AN) i la nicotinamida (Nam) per tal de corroborar els resultats obtinguts en estudis previs sobre el seu efecte protector (Saguer *et al.*, 2003), donat que lleugeres modificacions en el procediment de recollida de la sang podien comportar canvis en els resultats obtinguts. Posteriorment, es va provar de combinar aquests compostos quelants amb altres substàncies, jugant en alguns casos amb la concentració d'aquestes darreres. En qualsevol dels experiments duts a terme es va incloure sempre un control i en aquells amb tractaments combinats també s'inclouïen els tractaments amb components individuals. Per determinar els possibles efectes de les substàncies afegides en el CHb es van mesurar els percentatges dels diferents derivats d'hemoglobina (ferrohemoglobina lligada o LHb, ferrohemoglobina no lligada o Hb, i metahemoglobina o metaHb) en solucions preparades a partir de mostres deshidratades (control i tractades) i/o els paràmetres de color CIE L*, a* i b* de la pols directament. Aquestes mesures es prenen tant just després de la deshidratació com al llarg del període d'emmagatzematge.

Experiment 1: Efecte dels agents quelants àcid nicotínic i nicotinamida

Com s'ha dit anteriorment, amb aquest primer experiment es pretenia comprovar l'efecte protector tant de l'àcid nicotínic (AN, 2 % p/v) com de la nicotindamida (Nam, 2,5 % p/v) enfront l'enfosquiment oxidatiu que pateix l'hemoglobina, especialment durant la deshidratació per atomització. Es va observar que, després de deshidratar, els valors dels tres paràmetres de color (L*, a* i b*) (Figura 3.1) de la pols de mostres tractades tant amb AN com amb

Nam eren superiors als del control, però amb un efecte menys evident en el cas de les mostres amb Nam. Així, l'addició d'AN proporcionava una pols més clara i més vermella, però també més groga, resultats que concorden amb els estudis realitzats per Sagner *et al.* (2003).

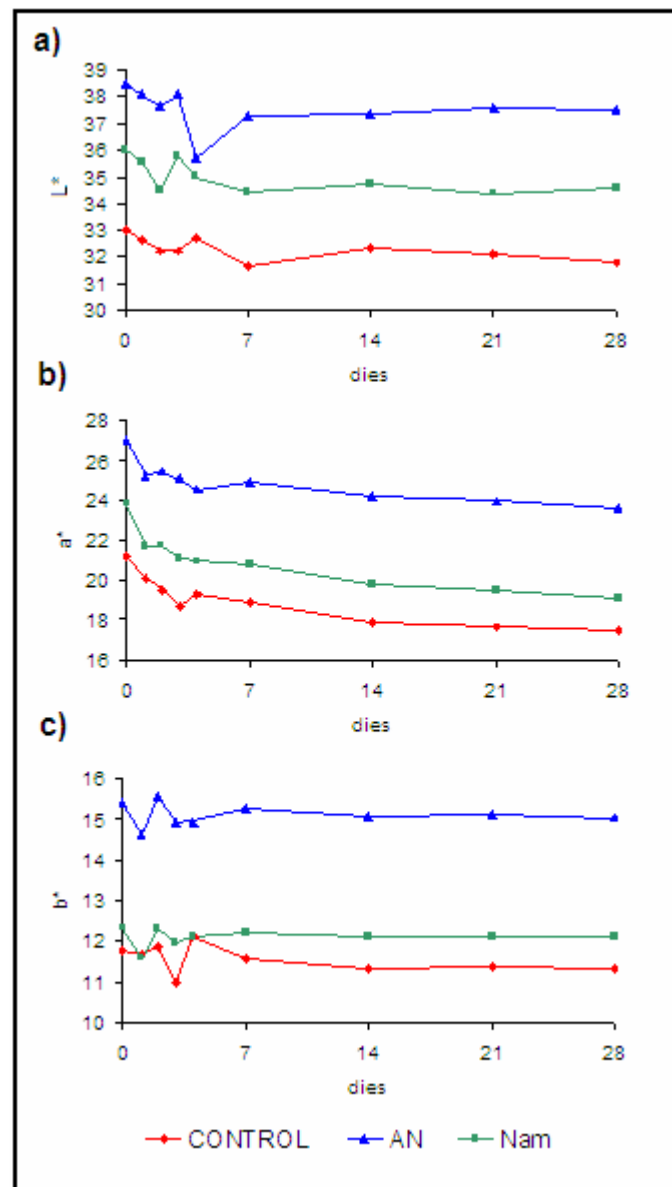


Figura 3.1. Evolució dels paràmetres del color L* (a), a* (b) i b* (c) del concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); i Nam: nicotinamida (2,5 % p/v).

D'altra banda, també es va poder observar que la lluminositat i el paràmetre a^* (Figura 3.1a i 3.1b) disminuïen ràpidament durant els tres primers dies d'emmagatzematge de la pols a temperatura ambient però d'una forma més progressiva la resta de l'assaig, tant en el control com en les mostres tractades. Per contra, el paràmetre b^* (Figura 3.1c) es va mantenir pràcticament constant al llarg del temps.

Experiment 2: Efecte combinat de la nicotinamida i l'àcid ascòrbic

Una vegada corroborats els efectes dels agents quelants AN i Nam sobre l'estabilitat del color de la pols del CHb, es va fer un nou experiment combinant Nam (2,5 % p/v) amb àcid ascòrbic (AA), donat que en els estudis realitzats per Toldrà (2002) s'havia observat que l'addició d'un 2 % (p/v) d'aquest compost tenia un cert efecte blanquejant i reduïa el fenomen d'enfosquiment que produïa el procés de deshidratació per atomització. En aquest segon experiment es va provar, doncs, la combinació d'ambdós, cadascun d'ells a la mateixa concentració que en els assajos individuals corresponents. No es va provar la combinació d'AN amb AA per tractar-se de dos àcids.

Tal i com es pot observar en la Figura 3.2, amb aquest tractament combinat, l'únic paràmetre de color que es va veure incrementat respecte del control va ser la lluminositat (Figura 3.2a). Per contra, els paràmetres a^* i b^* presentaven valors inferiors respecte del control (Figura 3.2b i 3.2c). Aquesta pèrdua de cromaticitat va portar a desestimar aquesta combinació de cares a anar aprofundint en les millores en l'estabilitat cromàtica de l'estabilitat del CHb en pols.

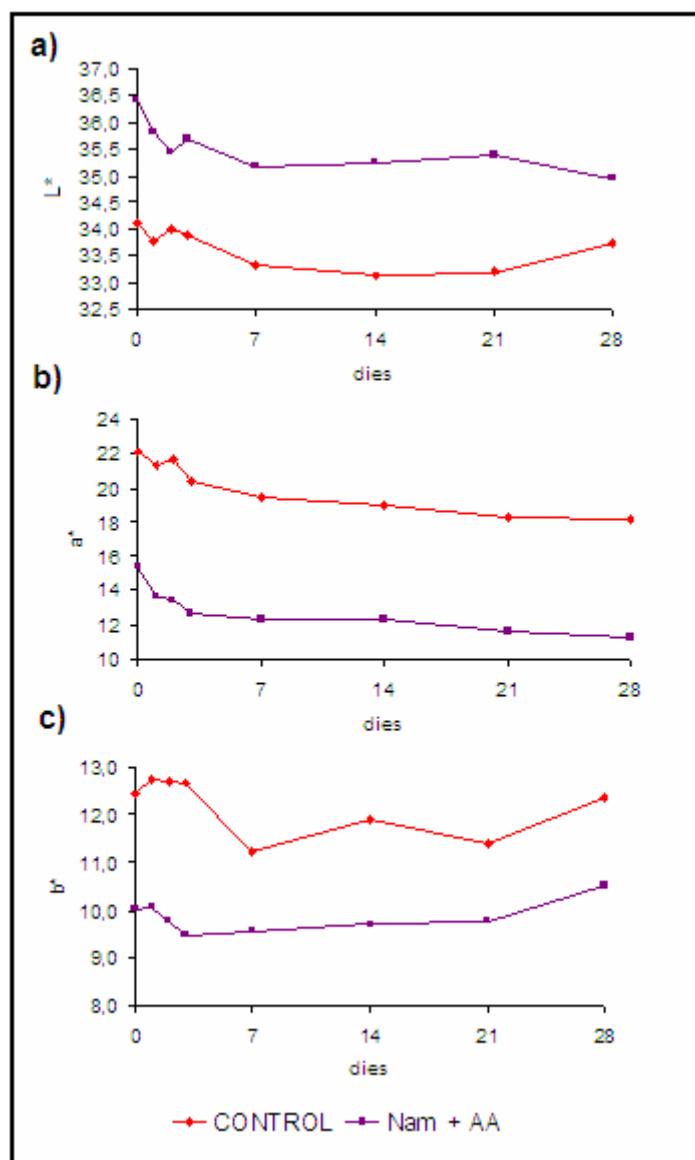


Figura 3.2. Evolució dels paràmetres del color L* (a), a* (b) i b* (c) del concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament: Nam+AA: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb àcid ascòrbic (2 % p/v).

Experiment 3: Acció combinada dels agents quelants amb glucosa

El pas següent va consistir en combinar els agents quelants (AN i Nam) amb glucosa (G, 2% p/v). Pel que fa al color de la pols, a la Figura 3.3 es pot observar que la combinació d'AN o Nam amb G (2 % p/v) va suposar un augment dels valors dels tres paràmetres de color respecte del control, encara que relativament petit en comparació a l'efecte dels agents quelants sols.

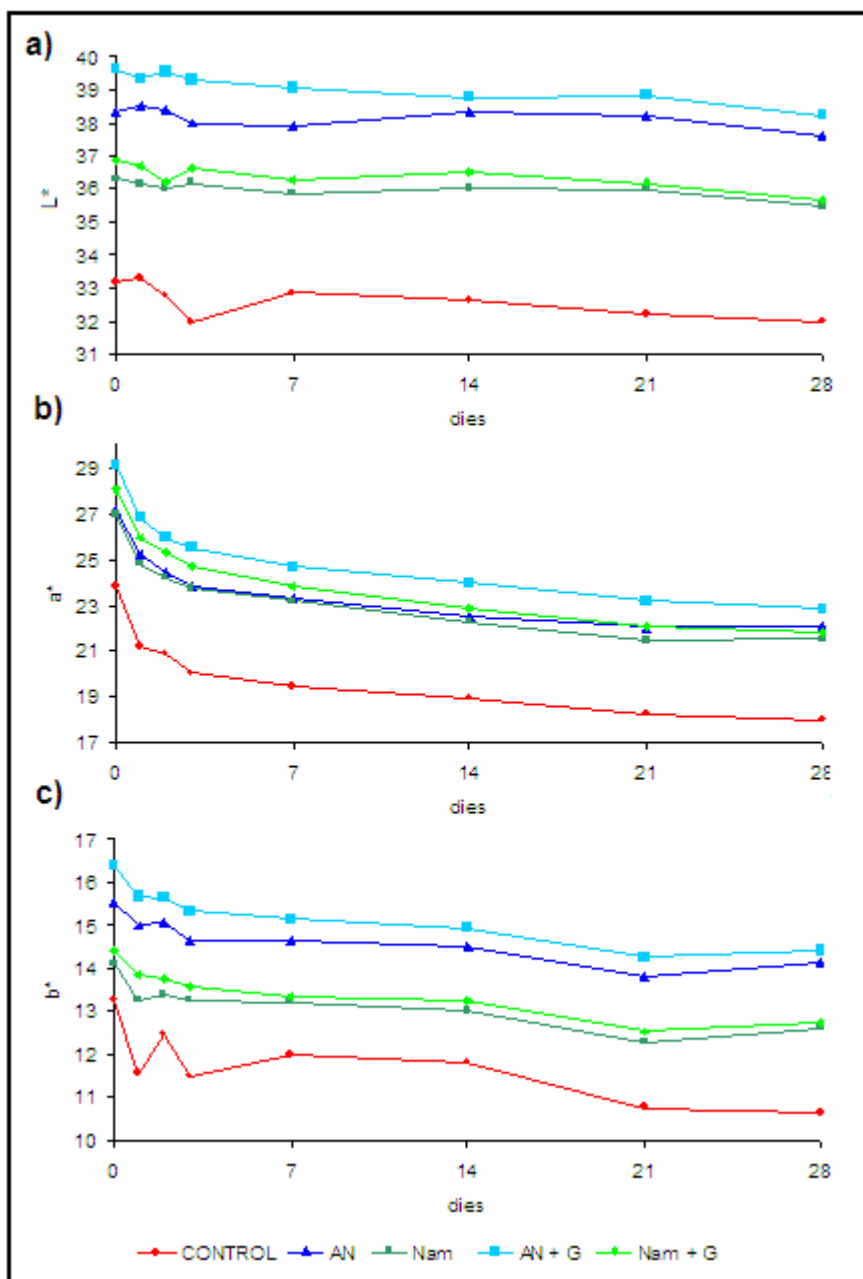


Figura 3.3. Evolució dels paràmetres del color L^* (a), a^* (b) i b^* (c) del concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); Nam: nicotinamida (2,5 % p/v); AN+G: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (2 % p/v); Nam+G: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (2 % p/v).

Tanmateix, aquesta lleugera millora dels paràmetres de color en les mostres tractades combinant un agent quelant amb G al 2 % p/v va portar a plantejar un nou experiment afegint concentracions més elevades de G. En aquest cas,

però, es va assajar només la combinació amb AN donada la impossibilitat de realitzar tots els tractaments sense que es malmetés la mostra.

Experiment 4: Combinació d'àcid nicotínic amb diferents concentracions de glucosa

En aquest cas, es va assajar la combinació d'AN amb concentracions superiors de G en relació a l'Experiment 3, concretament al 5 i al 10 % (p/v). En aquest assaig, a més, es va determinar l'efecte dels diferents tractaments sobre els percentatges dels diferents derivats de l'hemoglobina en la pols, és a dir, de ferrohemoglobina lligada (LHb), ferrohemoglobina lliure (Hb), i ferrihemoglobina o metahemoglobina (metaHb).

Tal i com es pot observar en la Figura 3.4, quant més elevada era la concentració de G afegida, majors eren els percentatges de LHb (Figura 3.4a) i menors els d'Hb (Figura 3.4b) i de metaHb (Figura 3.4c) just després de la deshidratació. Globalment, això es traduïa en un major efecte protector enfront l'oxidació del ferro hèmic a mesura que incrementava la concentració de sucre reductor.

Durant l'emmagatzematge es donava una disminució progressiva dels percentatges de LHb paral·lela a l'augment dels nivells de metaHb, per a totes les mostres analitzades. Al final del període d'estudi, les mostres additivades amb AN i un 10 % (p/v) de G presentaven un nivell d'oxidació de la molècula d'hemoglobina molt inferior al dels altres tractaments.

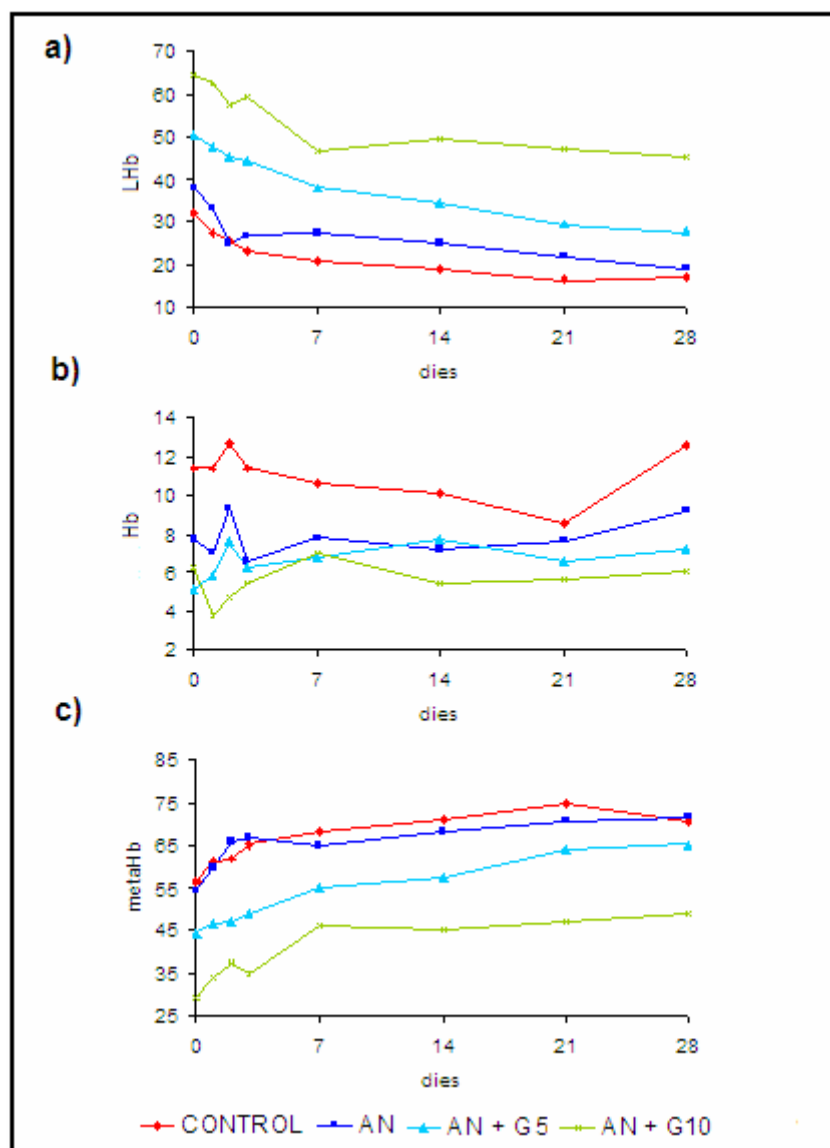


Figura 3.4. Evolució del % de ferrohemoglobina lligada o LHb (a), % de ferrohemoglobina no lligada o Hb (b), i % de metahemoglobina o metaHb (c) en solucions preparades a partir d'hemoglobina deshidratada per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); AN+G5: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (5 % p/v); i AN+G10: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v).

Com es pot veure en la Figura 3.5, l'increment del percentatge de G fins a un 10 % p/v va comportar una millora molt important en el color de la pols obtinguda, degut a l'augment dels valors de les coordenades cromàtiques, especialment en el cas dels paràmetres a^* i b^* (Figura 3.5b i c) i, en menor grau, de L (Figura 3.5a) en relació als altres tractaments additivats. D'aquesta

manera, s'obtenia una pols més clara i més vermella, encara que també més groga, que globalment es traduïa en una millora molt important del color a nivell de percepció.

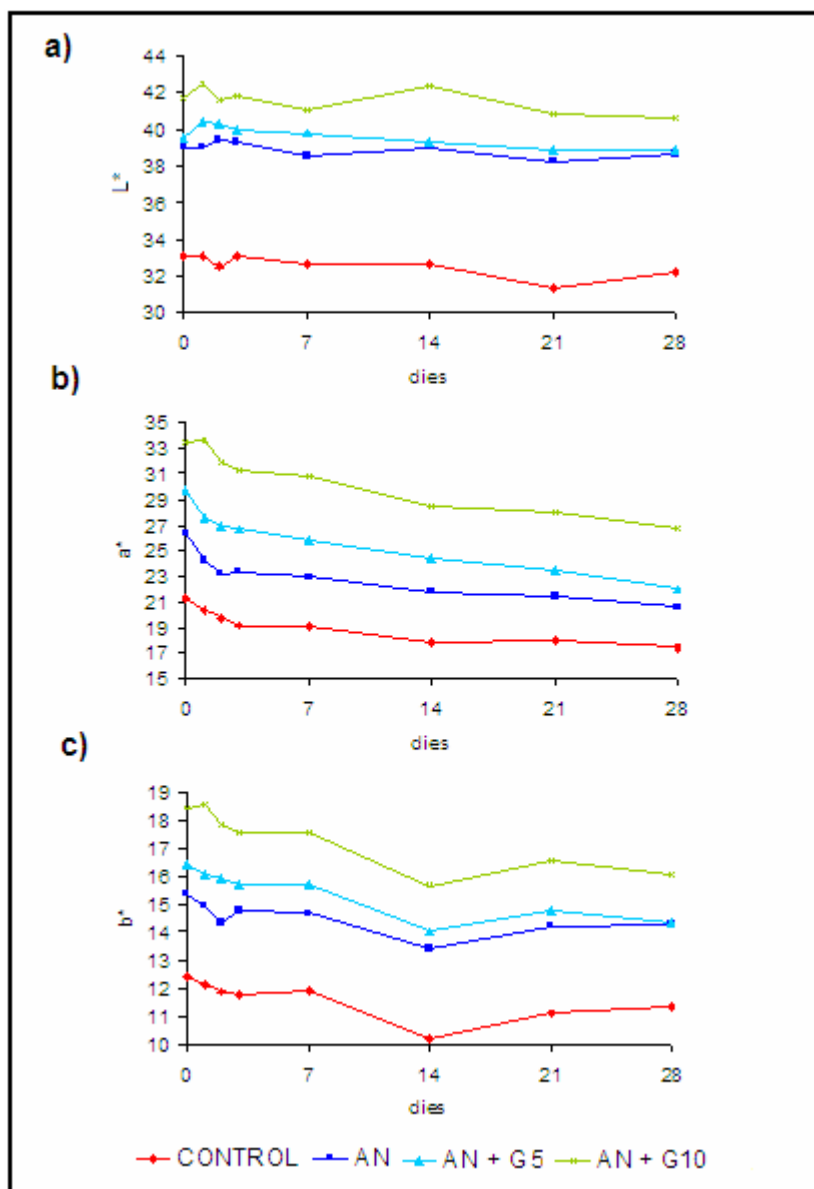


Figura 3.5. Evolució dels paràmetres del color L^* (a), a^* (b) i b^* (c) del concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); AN+G5: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (5 % p/v); i AN+G10: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v).

Tanmateix, aquests resultats no aportaven cap informació sobre el caràcter sinèrgic o additiu entre AN i G, quant a la protecció enfront l'oxidació.

Experiment 5: Combinació d'àcid nicotínic amb sucres reductors i no reductors

Tot i que la combinació d'AN amb G (10 % p/v) assajada en l'experiment anterior va suposar un important increment de l'efecte protector enfront a l'oxidació del ferro hèmic durant la deshidratació i el seu posterior emmagatzematge i, conseqüentment, una millora molt important en el color de la pols del CHb, es va voler conèixer com afectava la presència d'un sucre no reductor en l'estabilització del color, ja que en aquest cas no es donen reaccions d'enfosquiment associades a les reaccions de Maillard les quals involucren sucres reductors i grups amino presents en aminoàcids lliures o proteïnes, essent el més reactiu el present en la lisina, amb la conseqüent pèrdua de valor nutritiu que es dona. En aquest tipus de reaccions es pot donar una certa deshidratació del sucre, ruptura de cadenes, formació de compostos α -dicarbonílics i aparició de pigments foscos com les melanoïdines que poden conferir a la mostra des d'un to groguenc a un to marronós (Fennema, 1993). Per això es va provar la sacarosa (S). Tot i que també cal tenir en compte que la sola presència de sucres pot comportar un enfosquiment no-enzimàtic degut a les reaccions de caramel·lització si es treballa a temperatures elevades, les temperatures assolides durant la deshidratació (~80 °C) podrien no ser suficients perquè es donessin aquest tipus de reaccions.

D'altra banda, és important remarcar que la S es va assajar a una concentració inferior (5 % p/v) donat que té un poder edulcorant més alt que la G – el valor de poder edulcorant relatiu per a la glucosa és de 70 mentre que per a la sacarosa és de 100 (Mäkinen, i Söderling, 1980 citat per David S. Robinson, 1991) – i, d'aquesta manera, evitar endolcir excessivament la mostra.

A la Figura 3.6 es mostren l'efecte durant la deshidratació dels percentatges dels diferents hemoderivats i la seva evolució durant l'emmagatzematge de les mostres de pols. Tal i com es pot observar, la mostra tractada amb la combinació d'AN i S presentava un efecte protector superior al de l'AN quan s'afegia en solitari però, tot i que s'apropava molt, no assolía els nivells de la combinació amb G al 10 % p/v.

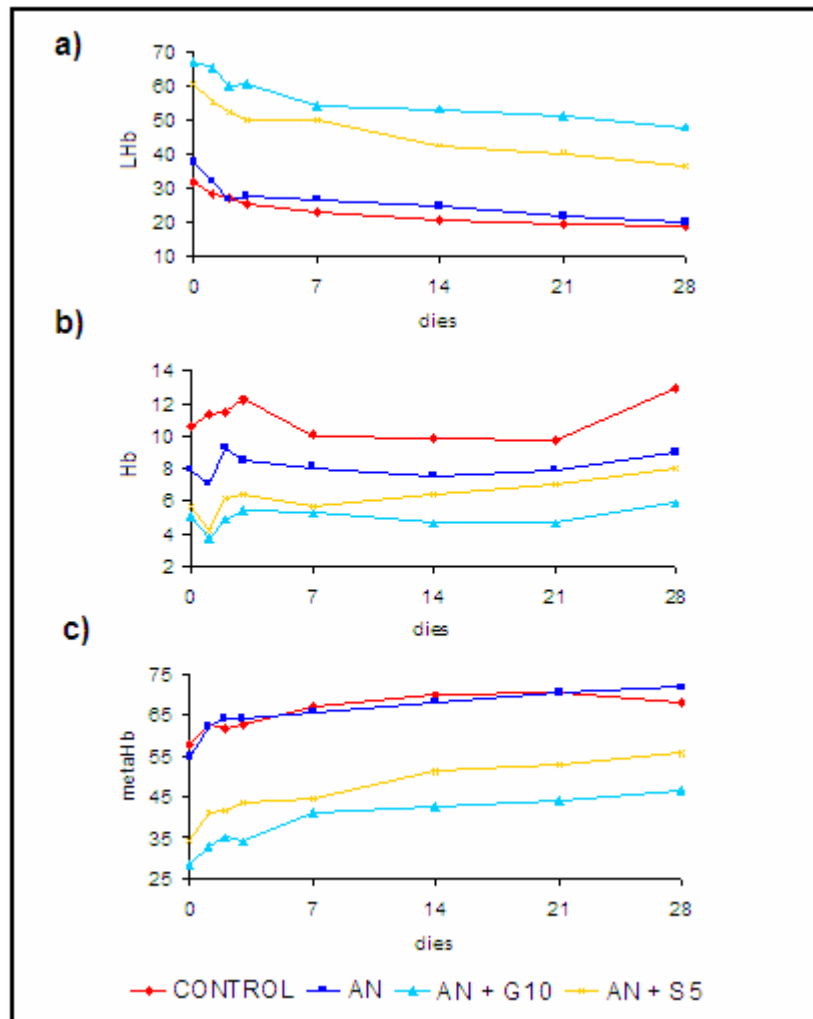


Figura 3.6. Evolució del % de ferrohemoglobina lligada o LHB (a), % de ferrohemoglobina no lligada o Hb (b), i % de metahemoglobina o metaHb (c) en solucions preparades a partir d'hemoglobina deshidratada per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); AN+G10: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); AN+S5: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb sacarosa (5 % p/v).

Els efectes dels diferents tractaments sobre el color de la pols (Figura 3.7) també indicaven que, tot i que la mostra tractada amb AN i S conjuntament presentava un augment de tots els paràmetres de color (L^* , a^* i b^*) respecte del control i de la mostra additivada només amb AN, les millores eren inferiors a aquelles obtingudes en el cas de la mostra amb AN i G. Tanmateix, cal tenir en compte que la concentració de S afegida era la meitat que la de G, i els resultats obtinguts mostren que amb un 5 % de S s'aconsegueix la meitat que

amb un 10 % de G (i uns valors similars als obtinguts en l'experiment anterior, per a la mostra additivada amb G 5 % p/v) així que es podria considerar un efecte de la concentració del sucre.

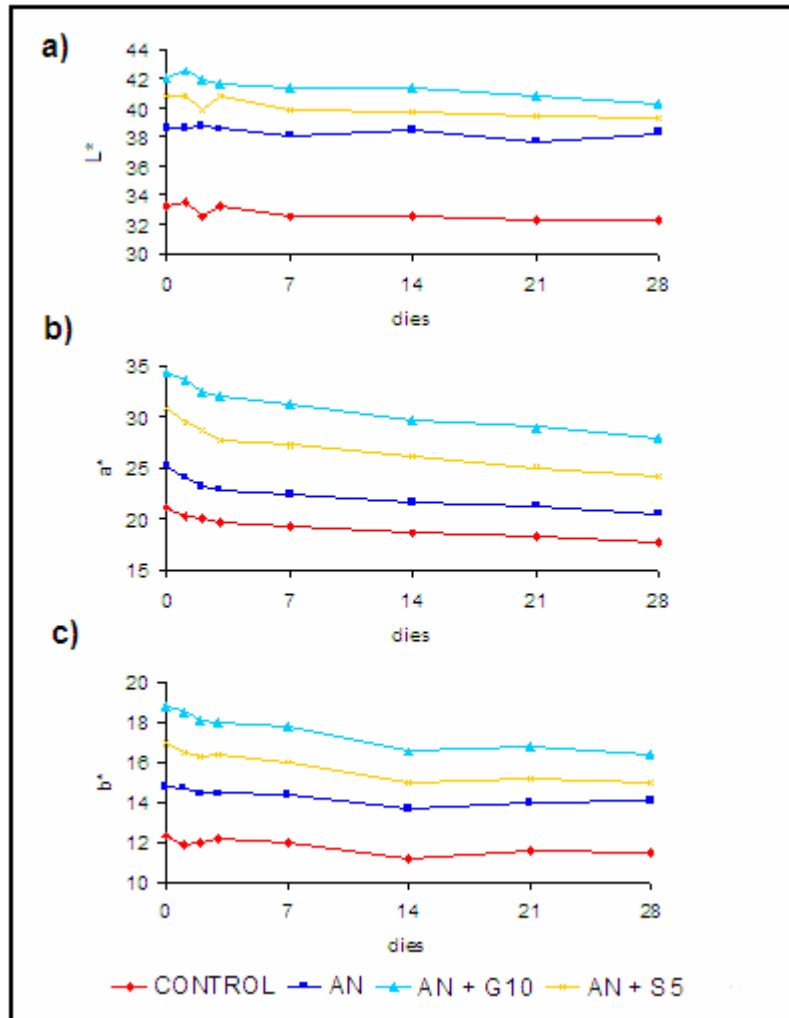


Figura 3.7. Evolució de L* (a), a* (b) i b* (c) en solucions preparades a partir d'hemoglobina deshidratada per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); AN+G10: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); AN+S5: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb sacarosa (5 % p/v).

Al llarg d'aquestes proves preliminars es va observar que, tot i els bons resultats que presentaven les mostres tractades amb AN pel que fa al color de la pols de CHb, aquests no es correlacionaven amb canvis en els percentatges

dels hemoderivats mesurats en solució. És a dir, malgrat que l'AN feia augmentar tots els paràmetres de color de la mostra de CHb, sembla que en el cas de que realment interaccioni amb el Fe del grup hèmic, ho faci d'una manera dèbil. Tanmateix, s'ha observat que els efectes negatius de l'AN sobre l'oxidació del ferro quedaven anul·lats en presència de G: quant més elevada era la concentració de G afegida, major era l'efecte protector enfront l'oxidació del ferro hèmic. Aquest efecte beneficiós enfront l'oxidació va fer pensar que la glucosa, en ser higroscòpica, podria retenir aigua al voltant de la molècula d'hemoglobina formant una capa que protegís la proteïna de l'oxidació.

3.2. Efecte de l'addició d'agents quelants i/o glucosa sobre l'estabilització del color de l'hemoglobina durant la deshidratació i el període d'emmagatzematge

A partir dels resultats obtinguts en les proves preliminars es van escollir aquells compostos que s'havien mostrat com a bons candidats per dur a terme un experiment seguint un disseny experimental que permetés el tractament estadístic de les dades. Tanmateix, i a partir dels resultats obtinguts en l'experiment 4 - en què es va assajar la combinació d'AN amb diferents concentracions de G -, es va plantejar la qüestió de si els bons resultats en aquest experiment eren deguts bàsicament a la G o bé a la combinació de les dues substàncies. També es va tenir en compte, tal i com ja s'ha comentat anteriorment, el fet que en estudis previs Saguer *et al.* (2003) havien observat que la pols d'hemoglobina estabilitzada amb Nam era menys sensible al pH que aquella estabilitzada amb AN quan el producte en pols s'aplicava en gels de midó com a matriu model. Tenint en compte totes aquestes consideracions, en aquest experiment es van assajar les següents condicions: àcid nicotínic (2 % p/v); nicotinamida (2,5 % p/v); glucosa (10 % p/v); àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); i nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (10 % p/v). En qualsevol dels experiments realitzats es va incloure un control.

3.2.1. Efecte sobre els percentatges dels diferents hemoderivats

La Figura 3.8 mostra la variació en els percentatges dels diferents derivats d'hemoglobina de solucions preparades amb pols obtinguda a partir de CHb en pols tractats amb agents quelants (AN o Nam) i/o G.

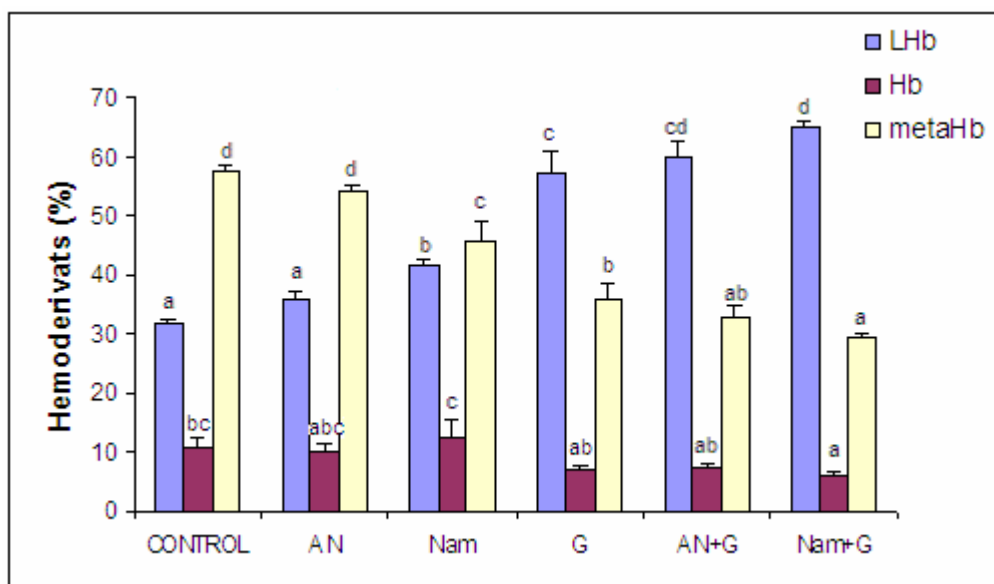


Figura 3.8. Percentatge dels hemoderivats (LHb, Hb i metaHb) en solucions preparades a partir de concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); Nam: nicotinamida (2,5 % p/v); G: glucosa (10 % p/v); AN+G: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); i Nam+G: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (10 % p/v). Mitjana \pm e.s. (n= 3). Lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0.05$) entre tractaments per a cada hemoderivat.

Com es pot observar, els resultats obtinguts just després de la deshidratació per a les mostres a les quals se'ls havia afegit només un agent quelant indiquen que mentre que la Nam realment protegeix l'hemoglobina de l'oxidació envers la deshidratació l'AN no evita la seva oxidació. També es va obtenir que la G exercia un efecte protector molt significatiu ($P < 0.05$), tant sola com en combinació amb els agents quelants. El tractament significativament ($P < 0.05$) més efectiu va ser aquell que combinava Nam+G, obtenint-se sempre majors percentatges de LHb i menors d'Hb i metaHb que en el control i en els

tractaments individuals. Malgrat que els valors mitjans obtinguts en el cas del tractament AN+G eren molt similars als d'aquell amb Nam+G, les diferències mai van ser significatives en relació al tractament només amb G. A partir d'aquests resultats es pot mantenir que en els tractaments combinats s'observava un efecte additiu més que sinèrgic entre aquest sucre i l'agent quelant i que la G era la principal responsable de l'efecte protector enfront l'oxidació de l'hemoglobina durant la deshidratació per atomització.

A la Figura 3.9 es mostra l'evolució dels percentatges dels diferents hemoderivats al llarg del període d'emmagatzematge (1 mes). Els resultats de l'ANOVA per a mesures repetides va indicar que, en qualsevol cas, el percentatge de LHb disminuïa significativament ($P < 0.05$) durant aquest període, tot i que el patró de reducció depenia del tractament. En el cas de les mostres que contenien G (sola o en combinació), es donava una disminució quasi lineal durant aquest temps mentre que en la seva absència el comportament era més aviat polinomial, amb la reducció més important tenint lloc durant els tres primers dies d'emmagatzematge i, a partir d'aquest moment, tendint cap a estabilitzar-se. Per contra, els continguts d'Hb i metaHb incrementaven significativament ($P < 0.05$) durant l'emmagatzematge, encara que el patró de variació depenia de l'hemoderivat específic. Mentre que en el cas de l'Hb es donaven variacions relativament petites al llarg del temps, els resultats obtinguts per a la metaHb indicaven que el procés d'oxidació del Fe hèmic continuava durant l'emmagatzematge, mantenint-se les diferències entre tractaments observades just després de la deshidratació.

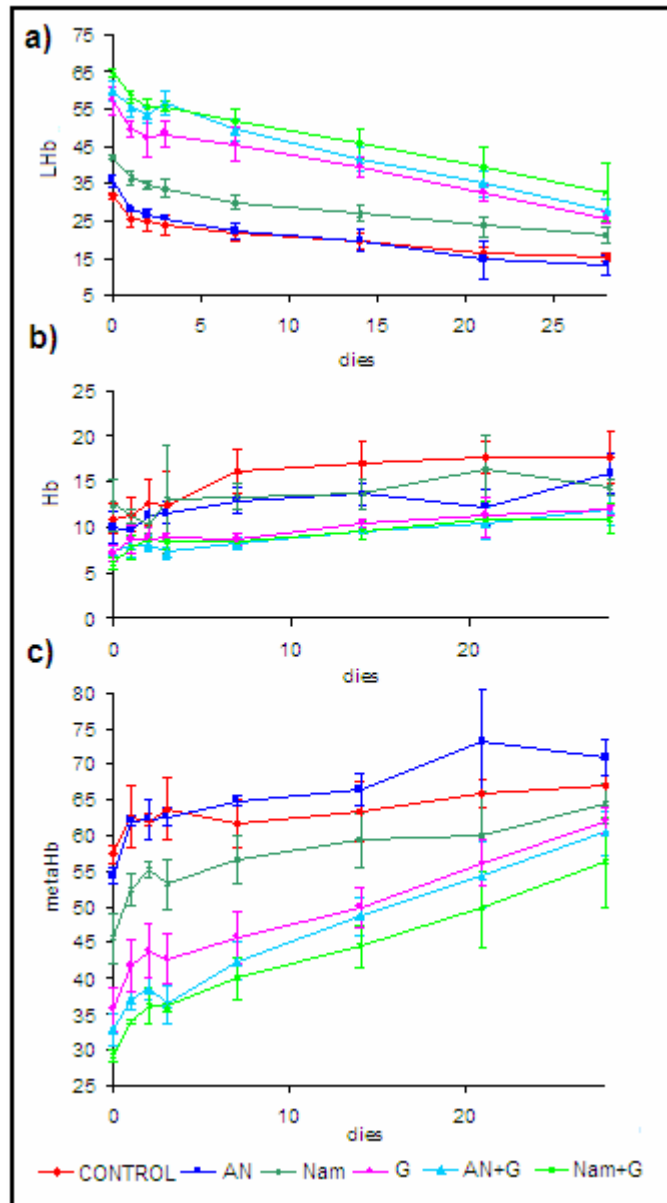


Figura 3.9. Evolució del % de ferrohemoglobina lligada o LHB (a), % de ferrohemoglobina no lligada o Hb (b) i % de metahemoglobina o metaHb (c) en solucions preparades a partir de concentrat d'hemoglobina deshidratat per atomització, en funció del tractament. AN: àcid nicotínic (2 % p/v); Nam: nicotinamida (2,5 % p/v); G: glucosa (10 % p/v); AN+G: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); i Nam+G: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (10 % p/v). Mitjana \pm e.s. (n= 3)

3.2.2. Efecte sobre el color del concentrat d'hemoglobina deshidratat

Pel que fa els paràmetres de color del producte deshidratat, a la Figura 3.10 es pot observar que els resultats de les mostres tractades només amb els agents quelants concorden amb els obtinguts en els experiments previs, en els que es van obtenir valors superiors als del control per als tres paràmetres de color, però amb un efecte menys evident per a la Nam. També s'observa que en combinar la G (10 % p/v) amb els agents quelants, els valors per als tres paràmetres de color van augmentar de forma important. En el cas de la combinació AN+G, tant la lluminositat com el paràmetre b^* van ser els que van assolir un major valor en comparació a la resta de mostres tractades, mentre que per al paràmetre a^* tant la combinació amb AN com amb Nam van assolir valors similars per aquest paràmetre. Tanmateix, la pols de CHb tractada amb la combinació de Nam+G era la que presentava les millors característiques visuals del color, probablement perquè els menors efectes sobre el paràmetre b^* (tons més marronosos) en relació al tractament combinat amb AN compensaven els també menors efectes sobre la lluminositat (color més fosc). D'altra banda, en el dos tractaments combinats els efectes de l'agent quelant i del sucre eren aproximadament additius.

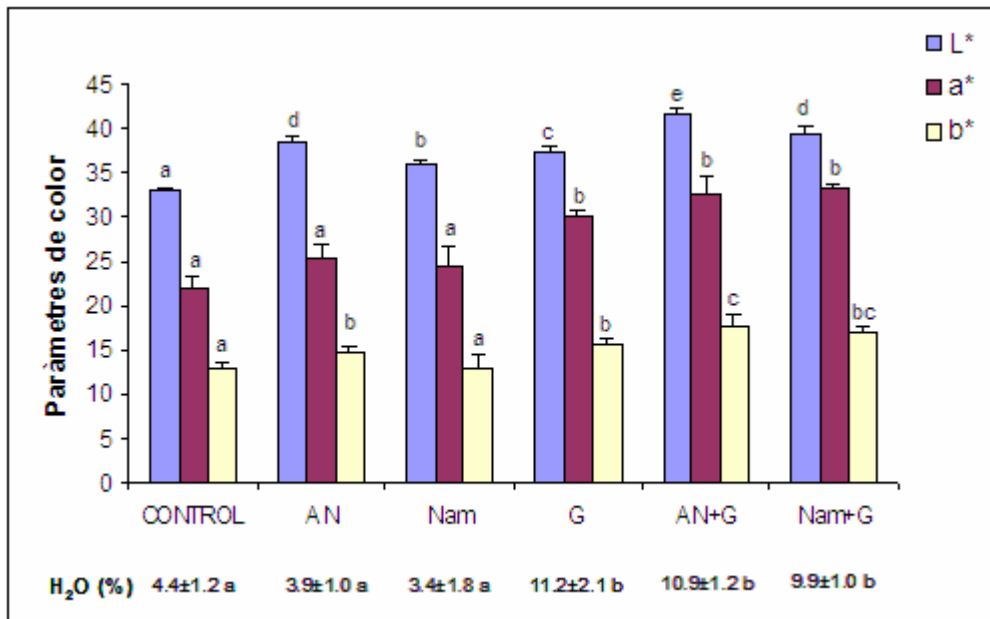


Figura 3.10. Paràmetres de color (L^* , a^* i b^*) i % de contingut d'aigua (expressat en percentatge de pes sec) del concentrat d'hemoglobina en pols, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); Nam: nicotinamida (2,5 % p/v); G10: glucosa (10 % p/v); AN+G: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); i Nam+G: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (10 % p/v). Mitjana \pm e.s. ($n=3$). Lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0.05$) entre tractaments per a cada paràmetre del color

D'altra banda, es va observar que la lluminositat (Figura 3.11a) disminuïa lleugerament al llarg del període d'emmagatzematge de la pols a temperatura ambient però amb una taxa més elevada durant els 3 primers dies tant en el control com en les mostres tractades, mentre que el paràmetre a^* disminuïa de manera molt més important en tots els casos (Figura 3.11b), fet que indicava que els processos d'oxidació del Fe eren rellevants durant l'emmagatzematge. En el cas d'aquesta coordenada cromàtica és important indicar el diferent patró de reducció dels valors en funció de si la mostra contenia G o no. En el primer cas, la reducció dels valors seguia una tendència lineal mentre que en el segon disminuïen de manera més important durant els primers dies i després de manera molt més suau. Aquest comportament diferencial podria ser conseqüència dels diferents valors assolits entre les mostres que contenen G i les que no. Quant al paràmetre b^* (Figura 3.11c), es va mantenir pràcticament

constant al llarg del temps en el control i en les mostres sense glucosa, mentre que en totes aquelles que contenien glucosa (sola o combinada) es donava una reducció lineal durant el període d'emmagatzematge seguint el mateix comportament que la coordenada a*.

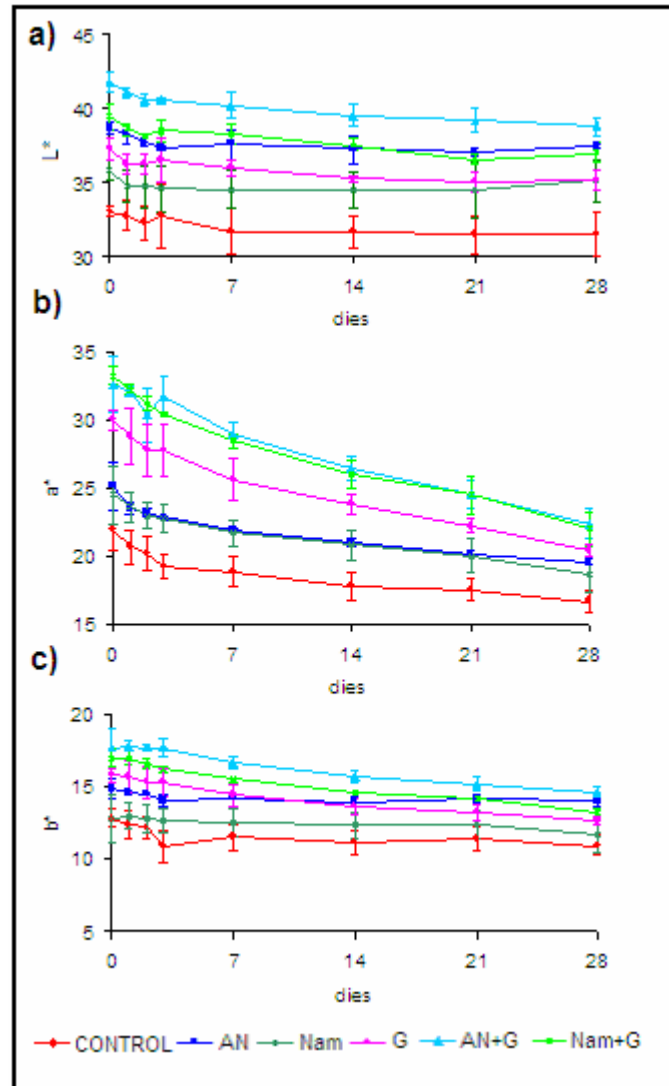


Figura 3.11. Evolució dels paràmetres del color L* (a), a* (b) i b* (c) del concentrat d'hemoglobina en pols, en funció del tractament: AN: àcid nicotínic (2 % p/v); Nam: nicotinamida (2,5 % p/v); G: glucosa (10 % p/v); AN+G: àcid nicotínic (2 % p/v) combinat amb glucosa (10 % p/v); Nam+G: nicotinamida (2,5 % p/v) combinada amb glucosa (10 % p/v). Mitjana \pm e.s. (n= 3).

Tal i com podem veure a la figura 3.10 les mostres additivades amb G (sola o en combinació) presentaven valors d'aigua residual de la pols més elevats que en els altres tractaments i, a més, aquest contingut era superior al de la capa monomolecular al voltant del 6 % en pes sec en el cas de l'hemoglobina deshidratada en les condicions d'aquest estudi (Toldrà, 2002) -, que sembla ser el contingut òptim d'aigua per a l'estabilitat de productes deshidratats (Labuza, 1976). En aquest cas, l'aigua pot reduir l'accessibilitat de l'oxigen a les molècules pigmentades i, d'aquesta manera, protegir-les contra l'oxidació (Pasch i Van Elbe, 1975; Kearsley i Katsaboxakis, 1980; Cohen i Saguy, 1983; Gloria *et al.*, 1995).

Segons els resultats obtinguts, els agents quelants afegits al CHb no modificaven apreciablement el contingut d'aigua de les mostres deshidratades, mentre que les tractades amb G (sola o en combinació) presentaven un augment significatiu del contingut d'aigua en la pols obtinguda després de la deshidratació. Sembla que la G, en ser higroscòpica, podria afavorir la retenció d'aigua al voltant de la molècula d'hemoglobina formant una capa que la protegís de l'oxidació com una barrera física.

4. CONCLUSIONS

1. Malgrat la superior capacitat de la nicotinamida (2,5 % p/v) per estabilitzar el ferro hèmic durant la deshidratació per atomització en comparació a l'àcid nicotínic (2 % p/v), aquest permet l'obtenció d'un concentrat d'hemoglobina en pols d'un color lleugerament més clar encara que també més groc i sense afectar la coordenada vermella en relació al tractament només amb nicotinamida.
2. La combinació d'un agent quelant (àcid nicotínic al 2 % p/v o nicotinamida al 2,5 % p/v) amb glucosa a elevades concentracions (10 % p/v) s'ha mostrat realment més efectiva protegint l'hemoglobina enfront l'oxidació del ferro hèmic tant durant la deshidratació per atomització com durant l'emmagatzematge de la pols a temperatura ambient en relació als tractaments només amb l'agent quelant. La menor oxidació del ferro es tradueix en una millora substancial del color de la pols.
3. En els tractaments combinant un agent quelant amb glucosa, ambdós a les concentracions prèviament indicades, s'ha observat un efecte additiu més que sinèrgic entre ells en relació a l'estabilització de la forma reduïda de l'hemoglobina. Per comparació amb els resultats dels diferents tractaments individuals es pot concloure que la presència de glucosa és la principal responsable de la menor oxidació del ferro hèmic.
4. El relativament elevat contingut d'aigua residual dels concentrats d'hemoglobina en pols que contenen glucosa (sola o en combinació amb un agent quelant) sembla ser el principal mecanisme de protecció enfront l'oxidació de l'hemoglobina tant durant la deshidratació per atomització com durant l'emmagatzematge de la pols a temperatura ambient.

5. BIBLIOGRAFIA

ANTONINI, E.; BRUNORT, M. 1971. Hemoglobin and myoglobin and their reactions with ligands, Amsterdam, Països Baixos, North Holland Publishing.

AUTIO, K. 1983. A new method for Globin and Heme Preparation from Blood Corpluscle Concentrate. Proc. Europ. Meeting Meat Res. Workers, Italy, 29: 765-770.

AYROSA, A.M.I.B. i PITOMBO, R.N.M. 1998. Determinación de la Oxidación de la Mioglobina en la Carne Cruda Liofilizada. Alimentaria, 294: 23-26.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. 1999. Química de los Alimentos. Saragossa. Ed. Acribia, S.A.

BENESCH, R.E.; BENESCH, R.; YUNG, S.; 1973. Anal Biochem., 55: 245-248.

BOOREN, A.M.; WEISS, G.M. 1988. Lean Skeletal Meat Trimmings Incidental to Slaughtering. A: Pearson, A. M. & Dutson, T. R. Edible Meat By-products. Advances in Meat, pàg. 219-230.

BRENNAN, J.G.; BUTTERS, J.R.; COWELL, N.D.; LILLY, A. 1980. Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Ed. Acribia, Saragossa. 540 pp. Traducció de: Food Engineering Operations. Ed. Applied Publishers Ltd., London.

BUCHBJERG, K.U. 1977. Isolering of globin samt funktionelle egenskaber of globin og hemoglobin, PhD. Thesis, Royal Vet. & Agric., University, Copenhagen.

CHEFTEL, J. C.; CUC, J. L. i LORIENT, D. 1989. Proteínas alimentarias. Bioquímica y propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Ed. Acribia S. A., Saragossa. 346 pp. Traducció de: Proteines alimentaries.

Biochimie-Propriétés fonctionelles-Valeur nutritionnelle-Modifications chimiques.
Ed. Technique et documentation, Paris.

CHEFTEL, J. C. i CHEFTEL, H. 1980. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen I. Ed. Acribia S. A., Saragossa. 333 pp. Traducción de: Introduction a la Biochimie et a la technologie des aliments. Volume I. Ed. Technique et documentation, Paris.

CLYDESDALE, F. M. 1984. Color measurement. A: Gruenmedel, D. W. i Whitaker, J. R. Food Analysis. Principles and Techniques. Pàg. 95-141. Vol I. Physical characterization. Ed. Marcel Dekker Inc., New York.

COHEN, E.; SAGUY, I. 1983. Effect of water activity and moisture on the stability of the beet powder pigments. J. Food Sci. 48: 703-707.

COLLADO, J. 1995. Situación medioambiental de la industria cárnica de Cataluña. Cárnica 2000, julio-agosto 1995: 43-47.

CORCUFF, N.; PINEL, M.; BOURGEOIS, C. M. 1985. La Décoloration du sang: Une Nouvelle de Valorisation. Viandes Prod. Carnés, 6: 10-12.

DE LAS FUENTES, L.; URKIAGA, A.; BERGANZA, J. i FONT, J. 1998. Minimización de vertidos y Aprovechamiento de Subproductos en Mataderos. Eurocarne, 71: 35-43.

DICKERSON, R.E.; GEIS, I. 1983. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology. Benjamin/Cummings Pub. Co.: Menlo Park, California.

EUROCARNE. 1998. El sector cárnico en 1997. Eurocarne, 63:25-33.

EUROCARNE. 1998. El sector de los mataderos y la producción de carne durante 1997. Eurocarne, 64:17-32.

FAO/WHO. 1973. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO ad hoc expert committee, World Health Organization Techn. Rep. Ser., núm. 522, WHO, Geneva.

FELIP BAHÍ, P. 1999. Estabilització del color de la fracció cel·lular de la sang de porc deshidratada per atomització mitjançant l'aplicació de substàncies antioxidants. Projecte de Final de Carrera de la titulació en Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Universitat de Girona.

FENNEMA, O.R. 1993. Química de los alimentos. Ed. Acribia S.A. Saragossa.

FERNÁNDEZ GINÉS, J.M.; ALESÓN CARBONELL, L.F.; FERNÁNDEZ LÓPEZ, J.; SAYAS BARBERÁ, E.; PÉREZ ALVAREZ, J.A. 2003. Medición objetiva del color en carne: importancia y relación con aspectos físicos y químicos. Alimentación, equipos y tecnología, 175: 39-42.

FERNÁNDEZ SAN JUAN, P.M. 2002. Aditivos alimentarios. Evaluación de su inocuidad y aspectos nutricionales. Alimentación, equipos y tecnología, 167: 89-102.

FONTES, P.R; GOMIDA, L.A. M.; RAMOS, E.M.; STRINGHETA, P.C.; PARREIRAS, J.F.M. 2004. Color evaluation of carbon monoxide treated porcine blood. Meat Sci., 68: 507-513.

FORT, N.; SAGUER, E. 2005. Isoformas de sorción del plasma de sangre de cerdo deshidratado por atomización. Alimentación, equipos y tecnología, 201: 71-74.

FRANCIS, F.J. 1993. Pigmentos y otros colorantes. Química de los Alimentos. Ed. Acribia S.A., Saragossa. Pàg. 615-657. Traducció de: Food Chemistry, Second edition. Ed. Marcel Dekker Inc., New York.

GLORIA, M.B.A.; VALE, S.R.; BOBBIO, P.A. 1995. Effect of water activity on the stability of bixin in an annatto extract-microcrystalline cellulose model system. *Food Chemistry*, 52: 389-391.

GORBATOV, V. M. 1988. Collection and utilization of blood and blood proteins for edible purposes in the U.S.S.R. A: Pearson A. M. i Dutson T. R. *Edible Meat By-products. Advances in Meat*. Pàg. 167-195. Ed. Elsevier Sci. publishers Ltd., London-Nem York.

GUZMAN, J.C.; McMILLIN, K.W.; BIDNER, T.D.; DUGAS-SIMS, S.; GODBER, J.S. 1995. Texture, Color and Sensory Characteristics of Ground Beef Patties Cointaining Bovine Blood Proteins. *J. Food Sci.*, 60: 657-660.

KEARSLEY, M.W.; KATSABOXAKIS, K.Z. 1980. Stability and use of natural colours in foods. Red beet powder, copper chlorophyll powder and cochineal. *J. of Food Tech.* 15: 501-514.

KUPPEVELT, A.V.; LEVIN, G.; REIZENSTEIN, P. 1976. Small Scale Production and Net Protein Utilization of Globin. *Nutrit. Reports International*, 13, 429.

LABRUDE, P.; CHAILLOT, B.; VIGNERON, C. 1987. Problems of haemoglobin freeze-drying: evidence that water removal is the key to iron oxidation. *J. Pharm Pharmacol.* May; 39: 344-8.

LABUZA, T.P.; ACOTT, K.; TATINI, S.R.; LEE, R.Y. 1976. Water activity Determination: A Collaborative Study of Different Methods. *J. Food Sci.*, 41: 910-917.

LEVIE, A. 1976. *The meat handbook*. 2^a ed. AVI. Wesport, Connecticut.

LORCA, C. 2001. Efecte de l'addició de substàncies antioxidants a la fracció cel·lular de sang de porc sobre l'evolució del color de la pols obtinguda mitjançant la deshidratació per atomització. Projecte de Final de Carrera de la

titulació en Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Universitat de Girona.

MAFART, P. 1994. Ingeniería Industrial Alimentaria. Ed. Acribia, S. A., Saragossa. 285 pp. Traducció de: Génie Industriel Alimentaire. Tome I: Les Procédés Physiques de Conservation. 1991. Technique et Documentation – Lavoisier.

MAPA. 2006. Hechos y cifras de la agricultura, la pesca y la alimentación en España (8ª edición revisada, actualizada y ampliada) Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid.

MAPA. 2007. Anuario de Estadística agroalimentaria 2006. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (MAPA). Madrid.

MÄKINEN, K.K.; SÖDERLING, E. 1991. A quantitative study of mannitol, sorbitol, Xylitol and xylose in wild berries and commercial fruits. J. Food Sci., 45: 367-374 (1980). A: ROBINSON, D.S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Ed. Acribia S.A.

MARTÍN YERO, M.; GARCÍA CAMPOS, J.; GUTIÉRREZ, S.; GONZÁLEZ, A. 1995. Tecnología de deshidratación de la sangre y sus fracciones. Alimentaria, 260: 49-53.

MARTÍN YERO, M.; VALLADARES, C.; GUERRA, M^a. A.; CASTRO, D.; CHANG, L. i CASAL, C. 1997. Suplemento Antianémico Líquido a partir de Sangre Entera. Alimentaria, 288: 99-101.

OCAK, A.; VALENTOUR, J.C.; BLANKE R.V. 1985. The effects of Storage-Conditions on the Stability of Carbon-Monoxide in Postmortem Blood. J. Anal. Toxicol., 9: 202-206.

OCKERMAN, H. W. i HANSEN, C. L. 1994. Industrialización de Subproductos de origen animal. Ed. Acribia S.A., Saragossa. 387 pp. Traducció de: Animal By-product Processing. 1988. V.C.H.

PARÉS, D.; CARRETERO, C. 1997. La sangre de matadero: subproducto de la industria cárnica. *Cárnica* 2000, 97: 49-54.

PARÉS, D. 1998. Caracterització i Revalorització de la Fracció Plasmàtica de la Sang de Porc procedent d'Escorxadors Industrials. Tesi Doctoral, Universitat de Girona.

PASCH, J.H.; VAN ELBE, J.H. 1975. Betanine degradation as influenced by water activity. *J. of Food Sci.* 40: 1145-11-46.

PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS-BARBERÁ M.E. i CARTAGENA-GARCIA R. 1998. Caracterización de los parámetros de color de diferentes materias primas usadas en la industria cárnica. *Eurocarne*, 63:115-122.

PIZARRO, D. 2000. Las aguas residuales en la industria agroalimentaria. *Mataderos. Alimentación, equipos y tecnología*, 10: 89-93.

POMERANZ, Y. 1991. *Functional Properties of Food Components*. Second Edition. Ed. Academic Press Inc., California. 571 pp.

PRIMO YÚFERA, E. 1997. *Química de los alimentos*. Ed. Síntesis S.A., Madrid. 461 pp.

RANKEN, M. D. 1980. Applications of Blood Proteins. A: Grant, R. A.; *Applied protein chemistry*. Pàg. 169-180. Ed. Applied science publishers, London.

ROBINSON, D. S. 1991. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Ed. Acribia S.A. Saragossa. 516 pp. Traducció de: *Food-Biochemistry and nutritional value*. Ed. Logran Group Limited, London.

RODRÍGUEZ, I. 1994. Aprovechamiento de subproductos de la industria cárnica. Alimentación, equipos y tecnología, Abril: 69-73.

RUIZ, I.; VEIGA, M.; SANTIAGO, P.; BLAZQUEZ, R. 1993. Características de los efluentes de matadero. Alimentación, equipos y tecnología, Setembre: 77-83.

SAGUER, E.; ALTARRIBA, S.; LORCA C.; PARÉS, D.; TOLDRÀ, M. i CARRETERO, C. 2003. Colour Stabilization of Spray-dried Porcine Red Blood Cells Using Nicotinic Acid and Nicotinamide. Food Sci. Technol. Int., 9: 301-307.

SAGUER, E.; FORT, N.; MOMPIÓ, M. i CARRETERO, C. 2004. Efecto de la adición de cisteína sobre las propiedades gelificantes del plasma porcino a pH ácido. Alimentación, equipos y tecnología, 189: 86-91.

SALVADOR, P.; SAGUER, E.; PARÉS, D.; TOLDRÀ, M. 2005. Propiedades funcionales de la fracción celular de la sangre procedentes de mataderos. Alimentación, equipos y tecnología, 204: 45-50.

SATO, Y.; HAYAKAWA, S.; HAYAKAWA, M.; 1981. Preparation of Blood Globin through Carboxymethyl Cellulose Chromatography. J. Food Technol. 16: 81-91.

SOUVERAIN, R. 1988. Problemática general de los aditivos y de los auxiliares tecnológicos. A: Multon, J.L.; Aditivos i auxiliares de fabricación de las industrias. Pàg. 1-20. Traducció de: Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Ed. Lavoisier, Paris.

STRYER, L. 1995. Bioquímica. 4ª Edició. Ed. Reverté, S.A. Barcelona. 440 pp.

TOLDRÀ, M. 1998. Deshidratació per Atomització de la Fracció Cel·lular de la Sang de Porc: Determinació de les condicions del Procés i Caracterització del

Producte en Pols. Treball de Recerca. Doctorat en Microbiologia i Bioquímica Aplicades. Universitat de Girona.

TOLDRÀ, M. 2002. Revalorització de la fracció cel·lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials. Tesi Doctoral. Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona.

TOLDRÀ, M.; SAGUER, E.; FELIP P.; PARÉS D. i CARRETERO C. 2000. Efecto de la adición de sustancias antioxidantes a la fracción celular de la sangre de cerdo sobre el oscurecimiento producido durante la deshidratación por atomización. Institut de Tecnologia Agroalimentària CeRTA. Escola Politècnica Superior. Universitat de Girona. Alimentación, equipos y tecnología, 3: 53-58.

TOLDRÀ, M.; CARRETERO, C. 1998. Isotermas de Sorción de la Fracción Celular de la Sangre de Cerdo Deshidratada por Atomización según Modelo GAB. Alimentaria, 294: 45-51.

TORRES, M. R.; RAMOS, A. J.; SORIANO, E. 1997. Aspectos funcionales y nutricionales de las proteínas sanguíneas: empleo en la industria cárnica. Alimentaria, Maig 282: 63-69.

TRITT, W. P.; SCHUCHARDT, F. 1992. Materials Flow and Possibilities of Treating Liquid and Solid Wastes from Slaughterhouses in Germany. Bioresource Technology, 41: 235-245.

WESTLAND, S.; GRAHAM, C.; ADDISON, S.; SHARROTT, P.; RIGG, B. 2001. Effect of sleeve colour and background colour on change-in-colour assessments. Coloration Technology, 117 (3), 123-126.

WISMER-PEDERSEN, J. 1979. Utilization of Animal Blood in Meat products. Food Tech., Agost 79: 76-80.

WISMER-PEDERSEN, J. 1987. Decoloration of Blood by Hem Oxidation. Proceedings. 33 Intern. Congress of Meat and Technol., I, 119.

WISMER-PEDERSEN, J. 1988. Use of haemoglobin in foods - A review. Meat Science, 24: 31-45.

YANG, J.H.; LIN, C.W. 1998. Functional properties of blood globin decolourized by different methods. Int. J. Food Sci. Technol., 33: 419-427.

YOUNG, C.R.; LEWIS, R.W.; LANDMANN, W.A.; DILL, C.W. 1973. Nutritive value of globin and plasma protein fractions from bovine blood. Nutr. Rep. Intl., 8, 211.

Webs consultades:

Asociación de Industrias de la Carne de España. Aice, 2006.

<http://www.aice.es/>

Promotora d'Exportacions Catalanes S.A. PRODECA, 2006.

<http://www.prodeca.cat/>

Federació Catalana d'indústries de la carn. FECIC, 2005.

<http://www.fecic.es/>