

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias

**Extracción, Aislamiento y Purificación de Albúmina
Sérica Bovina de Uso reactivo, por los métodos de,
Precipitación por Sales, Precipitación por Acido
y Termocoagulación Selectiva**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. Erick Blass Guzmán Muñante

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**TACNA — PERU
2005**

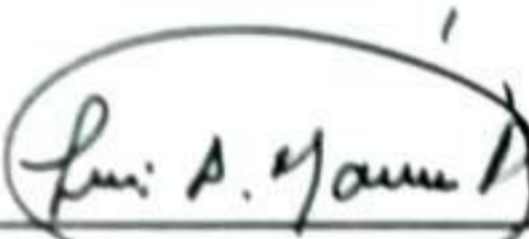
1
SYD
PCAG
ASIA

T. 340

APROBADO POR:



Mgr. Liliha Lanchipa Bergamini
Presidente Jurado Revisor



Ing. Luis Marín Allaga
Jurado Revisor



Ing. Rolando Céspedes Rossel
Jurado Revisor



Dr. Miguel Larrea Céspedes
Patrocinador

Este trabajo está dedicado a mis Padres, quienes me enseñaron a trabajar con las manos y a pensar con la cabeza, y a apreciar el valor de las dos cosas.

AGRADECIMIENTOS:

Les estoy profundamente agradecido, y siento que todo mi agradecimiento tenga que limitarse a estas palabras, muchas gracias.

- Al Dr. Miguel Larrea, patrocinador del trabajo de investigación, por su orientación en la ejecución del presente.
- Al Dr. Roberto Castellanos, co-patrocinador del presente trabajo de investigación, por su desinteresada ayuda y constante apoyo con sus enseñanzas diarias en toda la investigación.
- A las extraordinarias mujeres que han iluminado mi vida.
- A todos los profesores, amigos y personas que de alguna u otra forma me apoyaron para lograr la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Aspectos Generales de la Sangre Bovina	5
2.1.1. La Sangre.....	5
2.1.2. Composición y características de la sangre.....	6
2.1.3. Principales Componentes de la Sangre.....	7
2.1.3.1. Plasma.....	7
2.1.3.1.1. Composición del plasma.....	7
2.1.3.2. Corpúsculos Rojos.....	12
2.2. Aspectos Tecnológicos de sistemas de extracción y procesamiento de la sangre	14
2.2.1. Métodos de recogida de sangre.....	14
2.2.2. Sistemas para el aprovechamiento de la sangre.....	15
2.2.2.1. Obtención de plasma.....	15
2.3. Técnicas para el análisis y purificación de proteínas	18
2.3.1. Electroforesis.....	18
2.3.2. Cromatografía de filtración en gel.....	23
2.3.3. Espectrofotometría de proteínas.....	25

2.3.4.	Determinación de concentración de proteínas.....	29
2.3.5.	Separación por Diálisis.....	30
2.3.6.	Separación por precipitación.....	31
2.3.7.	Centrifugación.....	34
2.3.8.	Cristalización.....	37
III	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1.	Materiales.....	40
3.1.1.	Material vidrio y utensilios.....	40
3.1.2.	Equipos.....	41
3.1.3.	Reactivos.....	42
3.2	Métodos de Investigación.....	43
3.2.1.	Lugar de Ejecución.....	43
3.2.2.	Materia Prima.....	43
3.2.3.	Procedimiento de la Investigación.....	44
3.2.3.1.	Materia Prima.....	44
3.2.3.2.	Estabilización.....	44
3.2.3.3.	Métodos Experimentales.....	45
3.2.3.4.	Transporte.....	46
3.2.3.5.	Centrifugación.....	46
3.2.3.6.	Delineamiento Experimental.....	48
3.2.3.7.	Optimización del Proceso en Función a las Variables Estudiadas	49

3.2.3.8. Métodos de aislamiento de Albúmina.....	50
3.2.3.8.1. Precipitación por Ácido.....	50
3.2.3.8.2. Precipitación por Sales.....	53
3.2.3.8.3. Temocoagulación Selectiva.....	57
3.2.4. Métodos Analíticos de Control.....	62
3.2.4.1. Métodos analíticos en la materia prima.....	62
3.2.4.1.1. Determinación de Humedad.....	62
3.2.4.1.2. Determinación de Proteínas.....	62
3.2.4.1.3. Determinación de Lípidos.....	62
3.2.4.1.4. Determinación de Cenizas.....	62
3.2.4.1.5. Determinación de Carbohidratos.....	62
3.2.4.2. Métodos Analíticos durante el proceso.....	63
3.2.4.2.1. Determinación de otras Proteínas.....	63
3.2.4.2.2. Determinación de Pureza de Proteínas	63
3.2.4.3. Métodos Analíticos para el producto final.....	63
3.2.4.3.1. Determinación de Pureza de Proteínas	63
3.2.4.3.2. Determinación de otras Proteínas.....	63
3.2.4.3.3. Determinación de Humedad.....	63
3.2.4.3.4. Determinación de Nitrógeno Total.....	64
3.2.4.3.5. Determinación de Cenizas.....	64
3.2.5. Primera Evaluación.....	64
3.2.5.1. Rendimiento.....	64

3.2.5.2. Humedad.....	65
3.2.5.3. Barrido espectrofotométrico.....	65
3.2.5.4. Electroforesis.....	66
3.2.6. Segunda Evaluación.....	68
3.2.6.1. Determinación de Cenizas.....	68
3.2.6.2. Determinación de Nitrógeno Total.....	68
3.2.6.3. Determinación de pH.....	68
3.2.7. Purificación (Cromatografía).....	68
3.2.8. Evaluación Final.....	69
3.2.8.1. Barrido espectrofotométrico.....	69
3.2.8.2. Electroforesis.....	69
3.2.8.3. Aplicación.....	70
3.2.8.4. Rendimiento.....	71
IV HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES.....	72
4.1. Formulación de la Hipótesis.....	72
4.2. Identificación de las Variables e Indicadores.....	72
4.2.1. Ensayo Preliminar.....	72
4.2.1.1. Variables Independientes.....	72
4.2.1.2. Variables Dependientes.....	73
4.2.2. Procedimiento Final.....	73
4.2.3. Indicadores.....	74

V	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	75
5.1.	Resultados del análisis de la materia prima.....	75
5.1.1.	Análisis Químico de la Materia Prima.....	75
5.2.	Resultados para el diseño experimental.....	76
5.2.1.	Resultados para el diseño preliminar.....	76
5.2.1.1.	Resultado Rendimiento para Citrato-Oxalato....	79
5.2.1.2.	Resultado Absorbancia para Citrato-Oxalato...	82
5.2.1.3.	Resultado Rendimiento para EDTA.....	85
5.2.1.4.	Resultado Absorbancia para EDTA.....	88
5.2.1.5.	Resultado del Proceso de Optimización en Función a las Variables Estudiadas LOG_R.....	90
5.3.	Resultados para la primera evaluación.....	93
5.3.1.	Evaluación del diseño experimental unifactorial.....	93
5.3.1.1.	Resultado de Rendimiento.....	93
5.3.1.2.	Resultado de Humedad.....	95
5.3.1.3.	Resultados de los screening.....	98
5.3.2.	Resultados de la electroforesis.....	105
5.4.	Resultados de la segunda evaluación.....	110
5.4.1.	Nitrógeno total.....	110
5.4.2.	Cenizas.....	110
5.4.3.	Análisis del pH.....	110

5.5.	Resultados de la purificación por cromatografía.....	110
5.5.1.	Screening después de la cromatografía.....	112
5.5.2.	Electroforesis después de la cromatografía.....	114
5.5.3.	Aplicación de la prueba Lowry.....	116
	5.5.3.1. Prueba de Hipótesis para Muestra de Albúmina (Temocoagulación selectiva) y Albúmina Patrón (Sigma Aldrich).....	119
	5.5.4. Análisis del rendimiento después de la Cromatografía	120
VI	CONCLUSIONES.....	122
VII	RECOMENDACIONES.....	124
VIII	BIBLIOGRAFÍA.....	125
IX	ANEXOS.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Percepción clásica de la albúmina sérica bovina.....	9
FIGURA N° 2: Sistema cerrado e higiénico de recogida de la sangre.....	14
FIGURA N° 3: Cuchillo para la recogida higiénica de la sangre.....	15
FIGURA N° 4: Sección de una máquina centrífuga para la obtención de plasma.....	16
FIGURA N° 5: Instalación de recogida y separación de sangre	17
FIGURA N° 6: Separación de la sangre con la composición de los dos productos de la separación.....	18
FIGURA N° 7: Flujograma experimental para la obtención de albúmina sérica bovina.....	45
FIGURA N°8: Superficie de respuesta para rendimiento usando Citrato-Oxalato.....	82
FIGURA N° 9: Superficie de respuesta para absorbancia usando Citrato-Oxalato.....	84
FIGURA N° 10: Superficie de respuesta para rendimiento usando EDTA.....	87
FIGURA N° 11: Superficie de respuesta para absorbancia usando EDTA.....	89
FIGURA N° 12: Superficie de respuesta para rendimiento / absorbancia usando Citrato-Oxalato.....	92
FIGURA N° 13: Diseño de caja para las medias, mediana y desviación, de métodos de obtención de albúmina bovina,	

para el rendimiento.....	95
FIGURA N° 14: Diseño de caja para las medias, mediana y desviación, de métodos de obtención de albúmina bovina, para la humedad.....	97
FIGURA N° 15: Screening de albumina patrón marca sigma aldrich.....	99
FIGURA N° 16: Screening de la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva.....	100
FIGURA N° 17: Screening de albúmina obtenida por el método de precipitación por sales.....	102
FIGURA N° 18: Screening de albúmina obtenida por el método de precipitación por ácido.....	103
FIGURA N° 19: Diseño de caja para las medias, mediana y desviación, de métodos de obtención de albúmina bovina, para la absorbancia.....	105
FIGURA N° 20: Evaluación electroforética de albúminas obtenidas por los tres métodos y comparación con hemoglobinas.....	107
FIGURA N° 21: Electroforesis de albúminas obtenidas por los tres métodos y albúmina patrón Sigma Aldrich.....	109
FIGURA N° 22: Cromatograma de albúmina sérica bovina, obtenida por el método de termocoagulación selectiva.....	111
FIGURA N° 23: Screening realizado a albúmina sérica bovina obtenida por el método de termocoagulación selectiva, después	

de la cromatografía de filtración.....	113
FIGURA N° 24: Electroforesis antes y después de la cromatografía de filtración en gel del método de termocoagulación selectiva..	115
FIGURA N° 25: Curva de calibración para la albúmina patrón Sigma Aldrich..	118
FIGURA N° 26: Curva de calibración de albúmina sérica obtenida por el método de termocoagulación selectiva.....	119

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO N° 1 : Porcentaje de sangre y peso promedio de animales procedentes del sacrificio.....	5
CUADRO N° 2 : Composición de la sangre.....	6
CUADRO N° 3 :Composición aminoacídica de la albúmina sérica bovina.....	9
CUADRO N° 4 : Niveles de las variables independientes.....	48
CUADRO N° 5 : Delineamiento Experimental.....	49
CUADRO N° 6 : Cuadro para la construcción de curva de calibración de proteínas.....	70
CUADRO N° 7 : Indicadores para albúmina sérica bovina.....	74
CUADRO N° 8 : Análisis proximal de la sangre bovina.....	75
CUADRO N° 9 : Matriz de planeamiento para anticoagulante citrato-oxalato.	78
CUADRO N° 10 : Matriz de planeamiento para anticoagulante EDTA.....	78
CUADRO N° 11 : Modelo de regresión, significancia y análisis de varianza, para rendimiento y absorbancia usando citrato-oxalato.....	80
CUADRO N° 12 : Modelo de regresión, significancia y análisis de varianza, para rendimiento y absorbancia usando EDTA.....	86
CUADRO N° 13 : Modelo de regresión, significancia y análisis de varianza, para rendimiento / absorbancia (LOG_R), usando citrato- oxalato.....	90

CUADRO N° 14 : Resultados de los rendimientos de la albúmina, por método de obtención.....	93
CUADRO N° 15 : Análisis de varianza para rendimiento a diferentes métodos de obtención de albúmina sérica bovina.....	94
CUADRO N° 16 : Resultados de las humedades de albúmina obtenidas por cada método de obtención.....	97
CUADRO N° 17 : Análisis de varianza para las humedades a diferentes métodos de obtención de albúmina sérica bovina.....	97
CUADRO N° 18 : Resultados de absorbancia de las albúminas obtenidas por cada método de obtención.....	98
CUADRO N° 19 : Análisis de varianza para las absorbancias a diferentes métodos de obtención de albúmina sérica bovina.....	104
CUADRO N° 20 : Absorbancias registradas para muestra Sigma Aldrich y termocoagulación selectiva.....	116
CUADRO N° 21 : Medias de posición y dispersión, para las curvas Lowry.....	117
CUADRO N° 22 : Prueba t student para comparación de medias.....	120

INDICE DE ANEXOS

ANEXO I :	Análisis de varianza para el rendimiento y absorbancia usando citrato-oxalato.....	130
ANEXO II :	Análisis de varianza para el rendimiento y absorbancia usando EDTA.....	131
ANEXO III :	Análisis de varianza para rendimiento / absorbancia (LOG_R), usando citrato-oxalato.....	132
ANEXO IV :	Prueba de significancia Tukey HSD según Stat Graphics 5.0; para el rendimiento (1° evaluación).....	132
ANEXO V :	Prueba de significancia Tukey HSD según Stat Graphics 5.0; para la absorbancia (1° evaluación).....	133
ANEXO VI :	Prueba de significancia Tukey HSD según Stat Graphics 5.0; para la Humedad (1° evaluación).....	133
ANEXO VII :	Datos obtenidos de la cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-75.....	134
ANEXO VIII :	Preparación de buffer para muestra de electroforesis de proteínas.....	135
ANEXO IX :	Preparación de buffer de corrida para electroforesis de Proteínas.....	135
ANEXO X :	Principios de funcionamiento de una cámara electroforética..	135
ANEXO XI :	Formula para pureza de proteínas.....	136

ANEXO XII :	Preparación de geles de Acrilamida.....	136
ANEXO XIII :	Esquema para el protocolo de análisis de proteínas en electroforesis.....	137
ANEXO XIV :	Fotografía de la centrífuga refrigerada digital.....	138
ANEXO XV :	Fotografía del proceso de la diálisis.....	138
ANEXO XVI :	Fotografía del equipo de electroforesis vertical PAGE – SDS.....	139
ANEXO XVII :	Fotografía del equipo cromatográfico.....	139
ANEXO XVIII :	Fotografía del equipo espectrofotómetro UV – Visible.....	140
ANEXO XIX :	Certificado de Análisis de albúmina sérica Sigma Aldrich.....	141

RESUMEN

El presente trabajo fue ejecutado en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias; y en el laboratorio de Análisis de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

En este trabajo de investigación consideró como objetivo principal la obtención de albúmina sérica bovina de uso reactivo, a partir de sangre bovina; la cual fue obtenida de animales sanos, sacrificados en el Camal Municipal de Calana.

Para la obtención de la albúmina sérica bovina se realizó un tratamiento preliminar a la materia prima, para determinar las condiciones ideales de obtención del plasma bovino, encontrándose una velocidad de centrifugación de 4500 rpm, con un tiempo de centrifugación de 20 minutos y con la adición de la mezcla citrato de sodio-oxalato de amonio al 0,4 % como anticoagulante; con estas condiciones se halló el mayor rendimiento de 47,315 % y con la menor hemólisis registrada de 0,436 de absorbancia.

Se utilizaron tres métodos de obtención de albúmina sérica bovina, el primero se obtuvo por el método de precipitación por sales, el segundo por termocoagulación selectiva y el tercero por precipitación por ácido. El método que presentó mejores resultados fue el de termocoagulación selectiva, obteniendo una proteína con un rendimiento de 24 g / l de plasma; una humedad promedio de 4,7 %; un pH de 6,2; con un grado de pureza del 98,75 % antes de la cromatografía.

La electroforesis demostró que esta proteína es idéntica a la albúmina sérica bovina patrón adquirida de Sigma Aldrich, presentando ambas las mismas características de recorrido electroforético y pureza.

Después de realizada la obtención de albúmina sérica bovina, se realizó una purificación por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-75, alcanzando una pureza de 99,9 % para el caso de el método de termocoagulación selectiva. También se realizó un análisis del rendimiento en la purificación por cromatografía en filtración en gel, encontrando un rendimiento del 84 % de proteína purificada.

Finalmente se realizó una prueba de aplicación con el método Lowry para las proteínas obtenidas por Sigma Aldrich (patrón) y la obtenida por termocoagulación selectiva; en donde se determinó por medio de la prueba estadístico t de Student que no existe diferencias significativas entre ambas proteínas.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad de dedicar una mayor atención al aprovechamiento de los desperdicios del matadero, ha estimulado el desarrollo de métodos para la conversión de estos materiales, tales como la sangre, huesos, grasas, etc; que no suelen tener aceptación por los consumidores. Por ello y con la finalidad de obtener algún beneficio económico de la sangre bovina, se procedió a buscar un método adecuado para la obtención albúmina sérica bovina de uso reactivo.

Desde el punto de vista alimenticio la sangre bovina contiene compuestos de elevado valor nutritivo; pero desde el punto de vista económico es difícil emplear la albúmina sérica bovina purificada en alimentos comunes, esto debido a su baja rentabilidad. Sin embargo, es posible utilizarla como reactivo para realizar una serie de pruebas y determinaciones biológicas de importancia científica.

La albúmina sérica bovina es una proteína de gran importancia en el área alimentaria; una de sus aplicaciones principales se da en el campo del análisis de los alimentos, siendo utilizada como patrón en la elaboración de las curvas de calibración para la cuantificación proteínas por los métodos de Biuret, Lowry, Bradford, etc. Así mismo se emplea como patrón para determinar pesos moleculares de proteínas desconocidas, mediante las técnicas de cromatografía de filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida.

Después de la ejecución del presente trabajo los tres métodos establecidos en este estudio serán de gran interés en la obtención de albúmina sérica bovina; debido a

que se encontrará el método para producir una proteína de calidad comercial, contribuyendo así con una alternativa para desarrollo económico y social de un sector de la región.

Para este trabajo se consideraron los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar los efectos de las variables independientes tiempo y velocidad de centrifugación sobre el rendimiento y grado de hemólisis durante la extracción de plasma sanguíneo, durante su separación por centrifugación; para obtener un mayor rendimiento y un menor grado de hemólisis en el plasma.
- 2.- Evaluar los efectos de los anticoagulantes EDTA y Citrato-Oxalato sobre el rendimiento de plasma, y grado de hemólisis del plasma, mediante la aplicación de un paquete estadístico; para precisar el uso del mejor anticoagulante.
- 3.- Determinar el grado de pureza de la albúmina sérica bovina obtenida por precipitación por ácido, precipitación por sales y termocoagulación selectiva utilizando la electroforesis en gel de poliacrilamida.
- 4.- Determinar el comportamiento de la albúmina sérica obtenida, mediante la construcción de curvas de calibración para cuantificación de proteínas utilizando el método de Lowry; para establecer una comparación con el patrón Sigma Aldrich.
- 5.- Evaluar el grado de pureza de la albúmina sérica bovina para el método que presente mejores condiciones, utilizando la cromatografía de filtración molecular; para examinar el grado de pureza final que logra esta técnica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de la sangre bovina

2.1.1. La sangre

La sangre animal es una fuente de proteínas y enzimas, usadas indirectamente en medicina como reactivos para la investigación y el diagnóstico de enfermedades. **Price (1994)**

La sangre en el momento del sacrificio de los animales, presenta del 3 al 5 % de su peso y puede tener diversas aplicaciones. Debido a su riqueza en proteínas (17 % P/P en promedio) la sangre, se considera a veces, como una "carne líquida" que conviene revalorizar más eficazmente, pero para ello es necesario utilizar sistemas de acopio que disminuyan los riesgos de contaminación microbiológica. **Cheffel (1989)**

CUADRO N° 1 : PORCENTAJE DE SANGRE Y PESO PROMEDIO DE ANIMALES PROCEDENTES DEL SACRIFICIO

Animales	Contenido de sangre expresada en % respecto al peso vivo	Peso en kg Animales
Vacuno	3-4 %	250-600
Cerdo	3-4 %	60-120
Ovino	4-4,5 %	35-60

FUENTE: MADRID, (1999)

2.1.2. Composición y características de la sangre

En principio y para propósitos técnicos, se puede decir que se compone de los constituyentes indicados en el cuadro nº 2.

CUADRO Nº 2 : COMPOSICIÓN DE LA SANGRE (g/100 g).

Constituyentes	Sangre entera		Plasma 60% de sangre entera	
Constituyentes no proteicos	83		92,1	
Agua	80,8		90,8	
Sales minerales	0,9		0,8	
Lípidos	0,2		0,1	
Otras sustancias	1,1		0,4	
Constituyentes proteicos	17	100 %	7,9	100 %
Globulinas	2,2	13 %	3,3	42%
Fibrinógeno	0,3	1,7 %	0,4	5,1%
Albúminas	2,8	16,5 %	4,2	53%
Estroma	1,7	10 %	-	-
Hemoglobina	10,0	59 %	-	-

FUENTE: CHEFTEL, (1989)

La sangre tiene aproximadamente una densidad de 1,05 kg/dm³, la densidad del plasma es de 1,03 kg/dm³. El valor del pH de la sangre cruda es 7,2; y el punto de congelación del plasma es de -0,5 °C a -0,6 °C. **Madrid (1999).**

2.1.3.Principales componentes de la sangre

2.1.3.1. Plasma

El plasma es una sustancia compleja; su componente principal es el agua, representa alrededor de 60–70 % de sangre original. También contiene proteínas plasmáticas, entre las que se encuentran la albúmina, principal agente responsable del mantenimiento de la presión osmótica sanguínea, el fibrinógeno y globulinas. **Ganong (1996)**

2.1.3.1.1. Composición del plasma

A) Proteínas

Las proteínas del plasma constituyen aproximadamente el 7-8 % en (p/p), entre las principales se encuentran las siguientes:

I. Albúmina sérica.- Es la proteína más abundante de la masa total de las proteínas plasmáticas, constituyendo aproximadamente el 50 % de las proteínas totales. **Moya (2000)**

Está constituida por una cadena peptídica única de 582 aminoácidos con una masa molecular igual a 66000 g/mol. Esta cadena se polimeriza en medio ácido. Contiene 17 enlaces S-S y un grupo SH libre.

La función biológica de la albúmina sérica esta ligada fundamentalmente a la fijación y transporte de pequeñas moléculas orgánicas endógenas o exógenas (hormonas, ácidos grasos, vitaminas,

antibióticos) o minerales (iones, metales). La fijación se hace generalmente por enlaces no covalentes y frecuentemente es reversible y no específica. **Cheffell (1989)**

Su estructura y propiedades físicas están bien establecidas, haciéndose muy notable su elevada solubilidad en solventes acuosos y su estabilidad en un rango amplio de temperatura.

Además de su solubilidad, la albúmina es una proteína notablemente estable a temperaturas hasta 70 °C. Según estudios realizados en la universidad de Harvard (1946), la presencia de pequeños iones orgánicos en las preparaciones de albúmina favorece su estabilidad térmica. **Moya (2000)**

Peters (1985), mostró una percepción clásica de la albúmina sérica bovina, conforme se indica en la figura nº 1. Entretanto Brown, (1975) presentó la composición aminoacídica de la albúmina sérica bovina, tal como se indica en el cuadro nº 3.

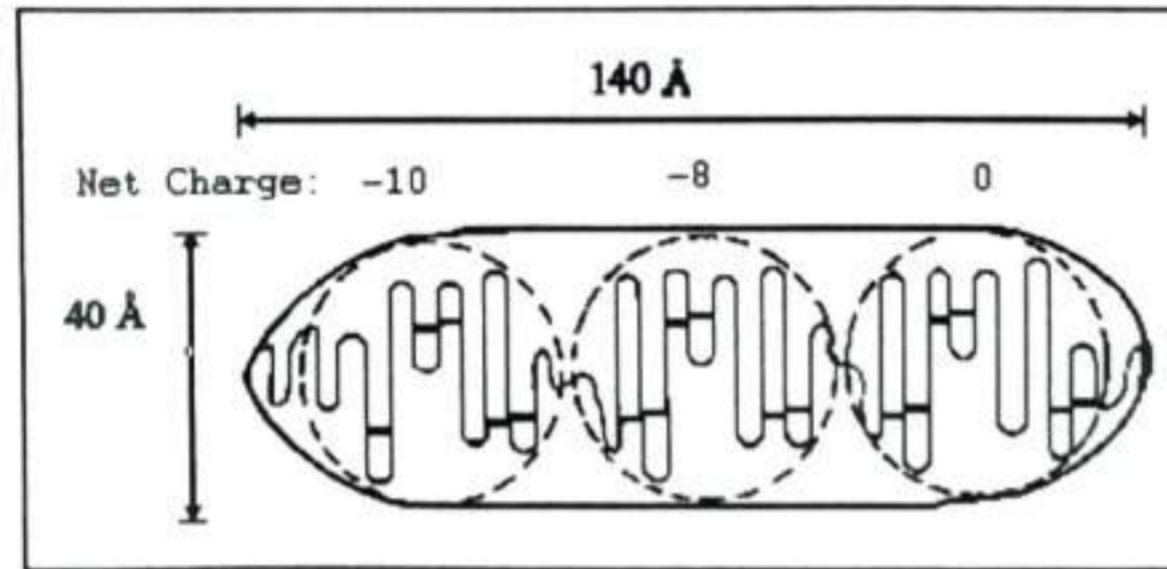


FIGURA N° 1 : PERCEPCIÓN CLÁSICA DE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA, DE FORMA ELIPSOIDE ACHATADA.
FUENTE: PETERS, (1985)

CUADRO N° 3 : COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

Ala 48	Cys 35	Asp 41	Glu 58
Phe 30	Gly 17	His 16	Ile 15
Lys 60	Leu 65	Met 5	Asn 14
Pro 28	Gln 21	Arg 26	Ser 32
Thr 34	Val 38	Trp 3	Tyr 21

FUENTE: BROWN, (1975).

- ii. Globulinas.-** Las globulinas son moléculas proteínicas insolubles en agua pura, pero solubles en soluciones salina; las globulinas séricas son una mezcla heterogénea, compleja, de moléculas proteínicas que con frecuencia se designa como globulinas α , β ó δ , en ocasiones con subíndices, todo basado en su movilidad electroforética.

- **α -globulinas**

A) En el grupo de las α 1-globulinas se distinguen:

- ✓ **Orosomucoide**, glicoproteína ácida; rica en glúcidos (40 %) y de una masa molecular de 41000 g/mol.
- ✓ **α 1-antitripsina**, glicoproteína de masa molecular de 54000 g/mol. Conteniendo 12 % de glúcidos. Se trata de un inhibidor de proteasas cuyo contenido (3 g/l, como media) varía en función a su estado fisiológico.
- ✓ **α 1-fetoproteína**, esencial para el desarrollo del embrión contiene 4,3% de glúcidos y posee una masa molecular de 70000 g/mol.

B) En el grupo de las α 2-globulinas, se distinguen especialmente:

- ✓ **α 2-macroglobulina** (2,5 g/l, 8 % de glúcidos y una masa molecular de 85000 g/mol).
- ✓ **Ceruloplasmina**, transportadora del 95 % del cobre plasmático (0,35 g/l, y una masa molecular de 150000 g/mol). **Harper (1998)**.

- **β -globulinas**

La transferrina es la proteína más importante de este grupo. Con una masa molecular de 80000 g/mol, contiene 6 % de glúcidos y asegura el transporte de hierro en el organismo. **Harper (1998)**.

- **δ-globulinas**

Representan una clase compleja de glicoproteínas, cuya parte principal la constituyen las inmunoglobulinas. Su importancia biológica proviene del hecho que son al mismo tiempo anticuerpos que tienen una función importante en la protección inmunitaria del organismo. **Harper (1998)**.

iii. Fibrinógeno.- Es el precursor de la fibrina, proteína responsable de la coagulación sanguínea. Es una gran molécula asimétrica, muy alargada constituida de tres tipos de cadenas peptídicas. Está bajo la forma de dímero con una masa molecular de 340000 g/mol. **Cheffell (1989)**.

B) Agua

El agua constituye aproximadamente el 91 % del total del plasma. **Madrid (1999)**.

C) Otras Sustancias Sólidas

Constituyen aproximadamente el 1-2 % del total del plasma, en el cual se encuentran los siguientes: sustancias inorgánicas (sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato), azúcares, hormonas, enzimas, lípidos, aminoácidos, y productos de degradación como urea y creatinina. **Madrid (1999)**.

2.1.3.2. Corpúsculos Rojos

Representa alrededor de 30-40 % de la sangre original; compuesta principalmente por eritrocitos, leucocitos y plaquetas. De las cuales los más importantes son los eritrocitos. **Madrid (1999).**

- **Agua**

Representa aproximadamente el 62 % del total de corpúsculos. **Madrid (1999).**

- **Glóbulos rojos o eritrocitos**

Tienen forma de discos redondeados, bicóncavos y con un diámetro aproximado de 7,5 micras. Contienen la hemoglobina, una proteína de las células rojas de la sangre, es el pigmento sanguíneo especial más importante y su función es el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. **Ganong (1996).**

La integridad del hematíe depende de la interacción de tres unidades celulares, que lo capacitan para realizar su función primaria de transporte de oxígeno y CO₂. Estas tres unidades celulares son la hemoglobina, la membrana eritrocitaria, y los elementos solubles intracelulares (enzimas, coenzimas, y substratos del metabolismo de la glucosa). La alteración de una de estas unidades da lugar a alteraciones en las otras dos, dando como resultado un acortamiento de la vida

media eritrocitaria (hemólisis) y provoca la aparición de hemoglobina libre en el plasma. **Harrison (2002)**.

- **Glóbulos blancos**

Hay en la sangre cinco tipos, ante todo están provistos de núcleo; al carecer de hemoglobina son incoloros. Estos elementos pueden moverse incluso contra la corriente sanguínea, e insinuarse por los intersticios de la pared vascular y así penetrar a los tejidos. Son menos numerosos que los glóbulos rojos. **Ganong (1996)**.

- **Plaquetas**

Son cuerpos pequeños, ovoideos, sin núcleo, con un diámetro mucho menor que el de los eritrocitos. Los trombocitos o plaquetas se adhieren a la superficie interna de la pared de los vasos sanguíneos en el lugar de la lesión y ocluyen el defecto de la pared vascular. **Ganong (1996)**.

- **Otras sustancias sólidas**

Constituyen aproximadamente el 1-3 % del total del corpúsculo. **Madrid (1999)**.

2.2. Aspectos Tecnológicos de sistemas de extracción y procesamiento de la sangre

2.2.1. Métodos de recogida de sangre

En la sangre que es recogida de manera natural existe el riesgo de contaminación de la misma con pelos, residuos, del animal, etc. Si va a ser posteriormente deshidratada y esterilizada para producir piensos, ello no importa; pero si se desea obtener un plasma para aplicaciones especiales, es preciso recurrir a un sistema de recogida especial, en esencia el sistema consta de un cuchillo o cánula hueca, como se observa en la figura nº 3; ésta que se introduce en el animal y que va conectado por una manguera de plástico a un tanque y a una bomba de vacío, como se muestra en la figura nº 2. Esta última succiona la sangre. La instalación va provista de un aparato dosificador con una solución anticoagulante un colador y un intercambiador de placas para enfriar la sangre hasta 4-8 °C, de ahí se almacena en un tanque. **Madrid (1999)**

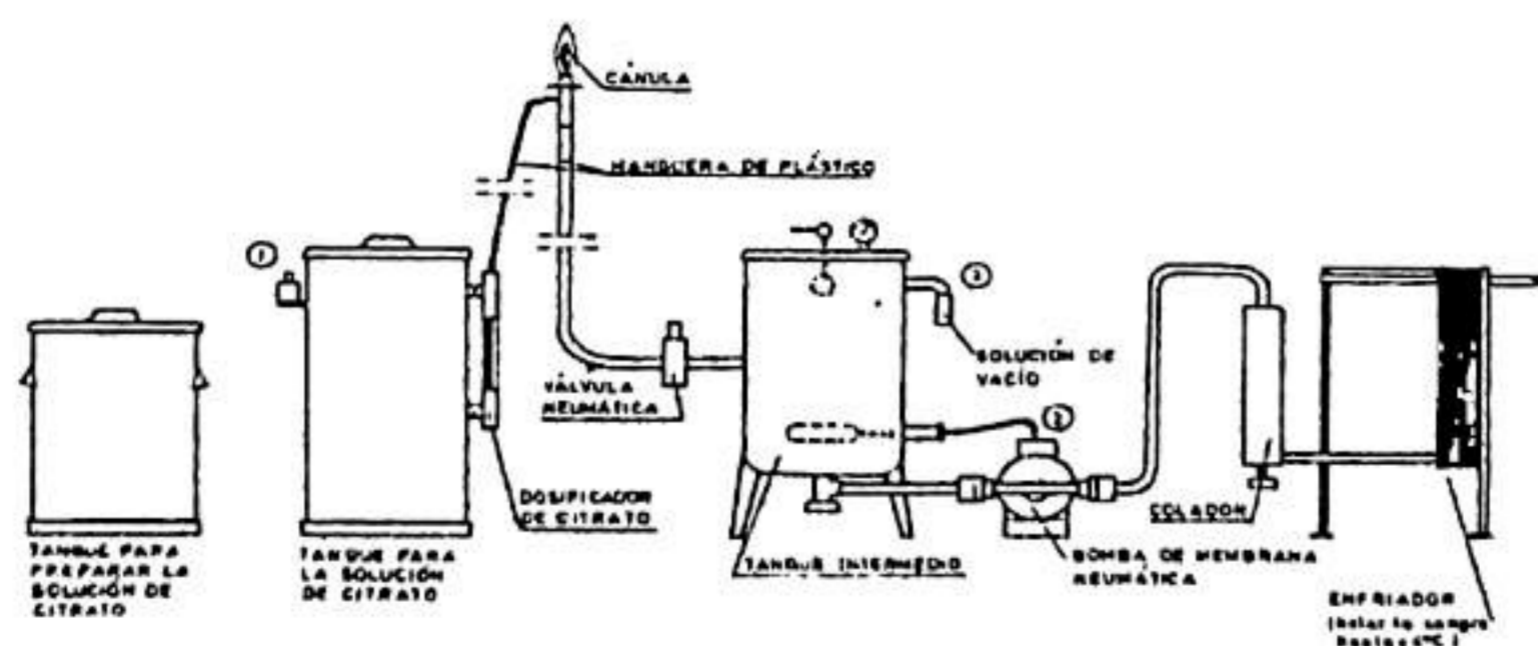


FIGURA Nº 2 : SISTEMA CERRADO E HIGIÉNICO DE RECOGIDA DE LA SANGRE.

FUENTE: ALFA LAVAL, (1999)

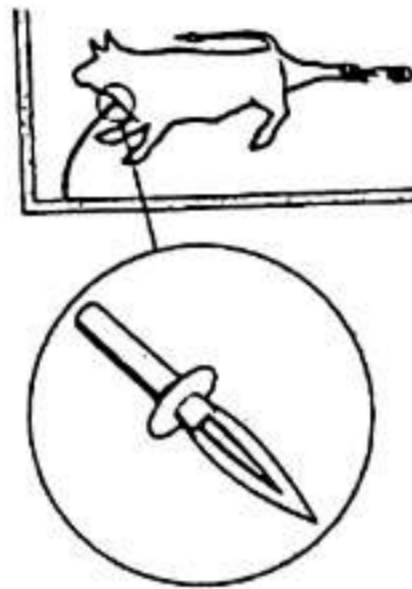


FIGURA Nº 3 : INTRODUCCIÓN DEL CUCHILLO EN EL ANIMAL PARA LA RECOGIDA HIGIÉNICA DE LA SANGRE.

FUENTE: ALFA LAVAL, (1999)

2.2.2. Sistemas para el aprovechamiento de la sangre

Los principales productos de la sangre son:

- Separación en plasma y corpúsculos.
- Obtención de harina de sangre por eliminación del agua.
- Producción de sangre soluble en polvo.
- Producción de plasma en polvo.

2.2.2.1. Obtención de plasma

La separación del plasma de los corpúsculos rojos de la sangre, se realiza por centrifugación de la sangre. Para ello inmediatamente después de su recogida se le inyecta un anticoagulante y después se procede a la

separación centrífuga para obtener por un lado el plasma y por otro corpúsculos rojos, tal como se muestra en la figura nº 4. **Madrid (1999)**

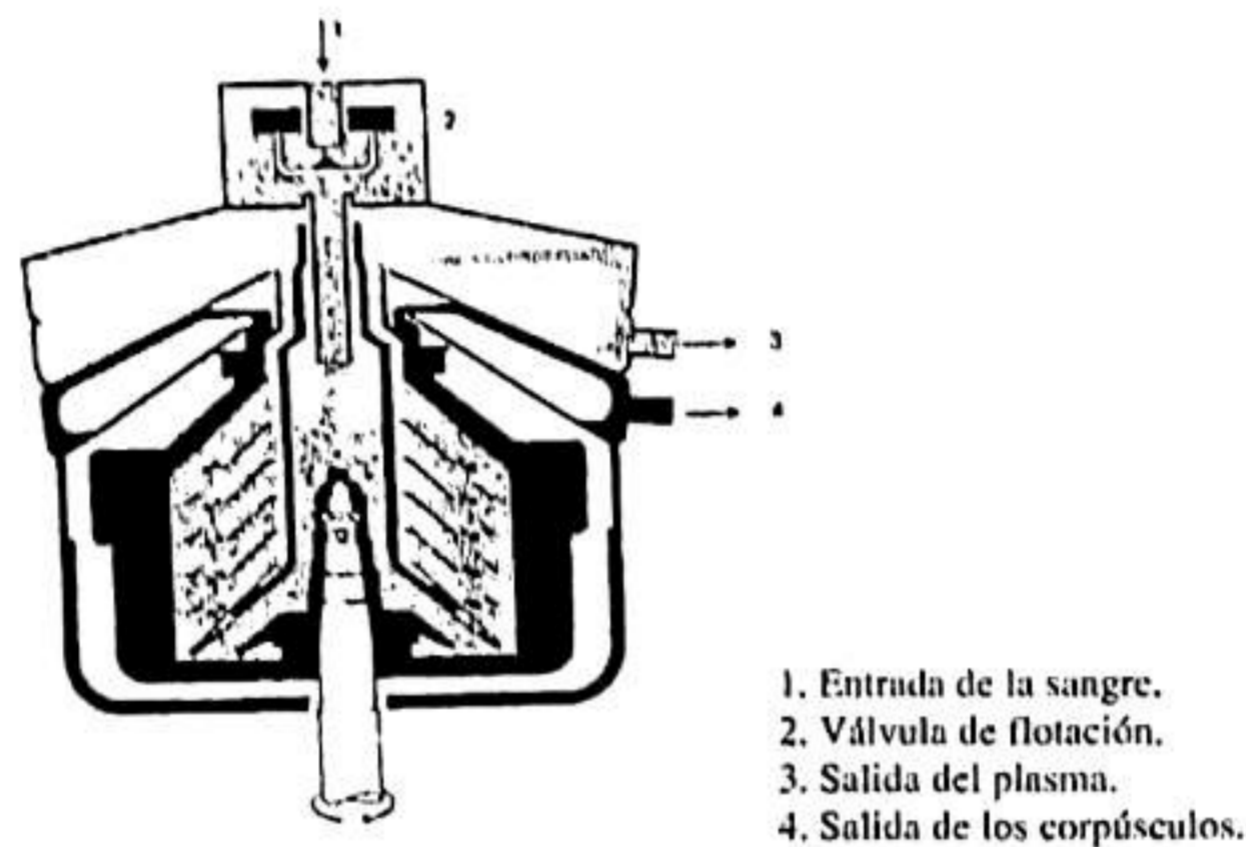


FIGURA Nº 4 : SECCIÓN DE UNA MAQUINA CENTRÍFUGA PARA LA OBTENCIÓN DE PLASMA A PARTIR DE LA SANGRE.
FUENTE: ALFA LAVAL, (1999)

Debido a la aceleración centrífuga creada dentro del cuerpo del equipo, los corpúsculos que son más pesados que el resto de los elementos, son lanzados a la periferia y de ahí expulsados de la separadora centrífuga. Los otros componentes de la sangre, los más ligeros, son eliminados por la parte central y descargados por la periferia. En estos procesos se utilizan velocidades de 2575 a 3250 rpm. **Madrid (1999).**

Como se sabe para la obtención de plasma para usos alimenticios son necesarios una serie de requisitos higiénicos adicionales para evitar cualquier tipo de contaminación en el proceso, como es disponer del sistema de

recogida higiénico; así como emplear animales sanos, determinando el estado de salud por inspección veterinaria directa en el momento del sacrificio. **Madrid (1999).**

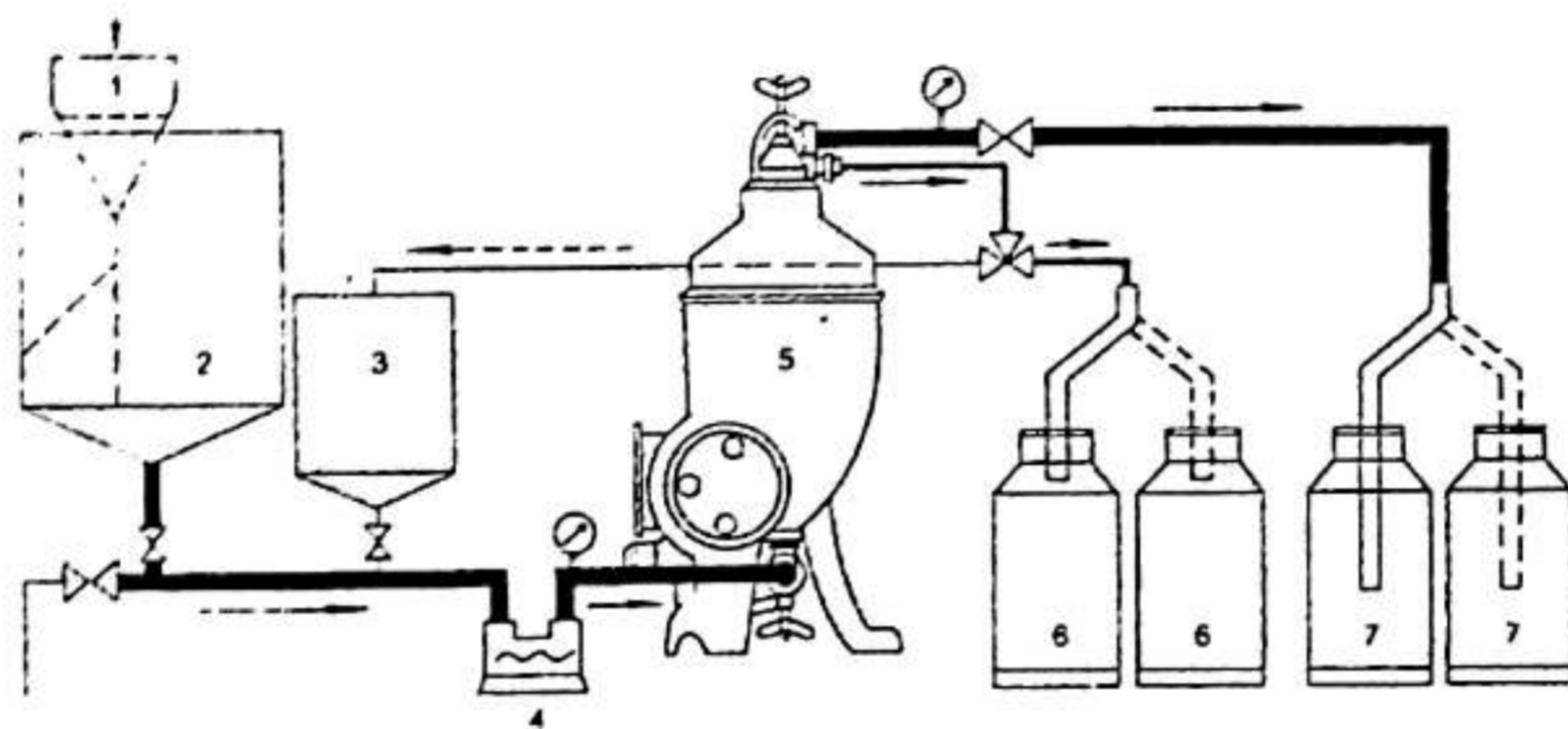


FIGURA N° 5: INSTALACIÓN DE RECOGIDA Y SEPARACIÓN DE SANGRE
FUENTE: ALFA LAVAL, (1999)

La figura nº 5 corresponde a una instalación para la recogida y separación del plasma y corpúsculos de sangre. En ella se aprecia como pasa primero por una especie de embudo con una tela o malla filtrante (1) y de ahí a un tanque para su recogida, fabricado de acero inoxidable, con una capacidad de 500 litros (2). Inmediatamente la sangre, a través de una bomba (4), es enviada a la separadora centrífuga (5) donde se produce la separación citada. Los corpúsculos rojos van a parar a los primeros bidones (6) y, el plasma a los siguientes (7). **Madrid (1999).**

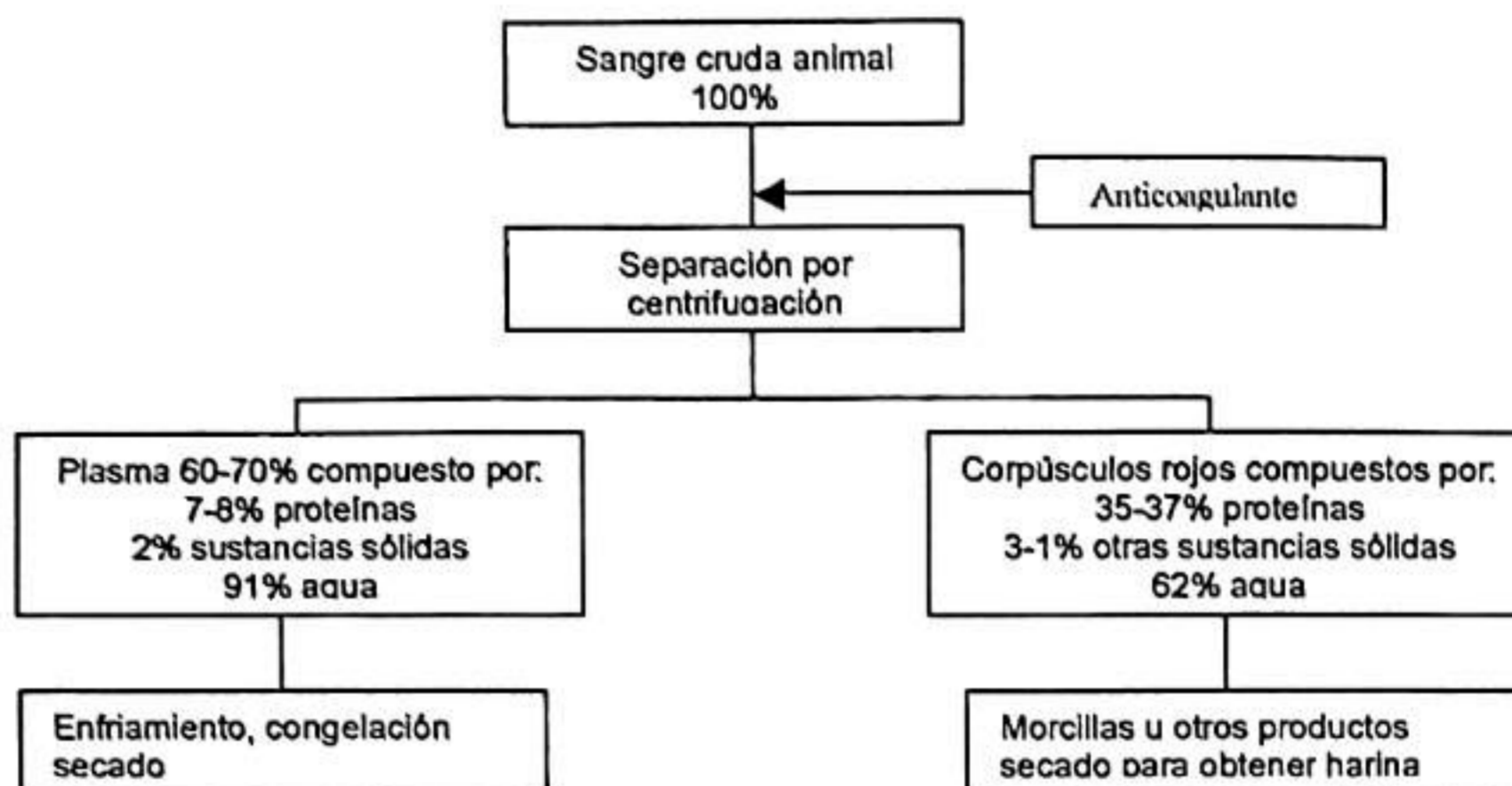


FIGURA Nº 6 : SEPARACIÓN DE LA SANGRE CON LA COMPOSICIÓN DE LOS DOS PRODUCTOS DE LA SEPARACIÓN (PLASMA Y CORPÚSCULOS Y SU PROPORCIÓN RELATIVA)
FUENTE: MADRID, (1999)

2.3. Técnicas para el análisis y purificación de proteínas

2.3.1. Electroforesis

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con una carga eléctrica neta son colocadas en un campo eléctrico, éstas experimentarán una fuerza de atracción hacia el polo que posea carga opuesta.

Así, si se deja transcurrir un cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo).

El movimiento de las moléculas está gobernado también por dos fuerzas adicionales; por un lado, la fricción con el solvente dificultará este

movimiento (es decir, al moverse los solutos chocarán con las moléculas de solvente que están en su camino), lo que genera una fuerza que se opone al movimiento; por otro lado, las moléculas tienen a moverse en forma aleatoria (movimiento browniano) debido a que poseen energía cinética propia. Esto se denomina difusión y sigue la llamada ley de Fick. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

La suma de todas estas fuerzas provoca que las moléculas no migren de una manera homogénea, de tal manera que, si las moléculas son colocadas en un cierto lugar de la solución, los iones comenzarán a moverse formando un frente cuya anchura aumentará con el tiempo.

Para reducir la anchura de este frente podemos reducir el movimiento de las moléculas empleando un medio que oponga más resistencia a dicho movimiento. Una forma común de hacer esto es formar un gel. El gel consiste de un polímero soluble de muy alto peso molecular que atrapa moléculas de agua y forma un tamiz molecular que dificulta el movimiento de los solutos.

Consecuentemente, la migración electroforética de las moléculas será más lenta, pero el ensanchamiento del frente se verá reducido también. Si ahora se aumenta la intensidad del campo eléctrico, se puede acelerar la migración molecular, pero no por ello variará la difusión y el frente migrará de un modo cada vez más compacto. Así, podemos mejorar la definición del frente aumentando la diferencia de potencial entre los polos y esto

estará limitado tan sólo la capacidad de la solución para disipar el calor generado por el paso de la corriente eléctrica. Esto último, debido a que si el calor se acumula se puede hacer hervir a la solución, e incluso descomponer el gel y/o los solutos.

La presencia del gel tiene una consecuencia adicional, ya que aquellas moléculas de mayor tamaño hallarán mayor resistencia al avanzar a través de los poros del gel que aquellas moléculas pequeñas. Por lo tanto, la fricción que se observa durante el movimiento electroforético en un gel depende de la masa y la forma de la molécula, en adición a su carga eléctrica.

Aunque el solvente puede, por si solo, producir una fricción diferente sobre diversas moléculas, su efecto es muy poco apreciable cuando no existe el entramado del gel. **García-Segura (1996).**

- **Electroforesis SDS-PAGE**

Es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS (SDS-polyacrilamide gel electrophoresis). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína

con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel ('stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS. Que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl⁻ de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking'). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl⁻ si hay una región de **'field strength'** (Campo de Energía). 'Field strength' es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración, El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que $[Cl^-] > [proteína-SDS] > [glicinato]$. Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl⁻ y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir

de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl^- deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad.

El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1,4 gramos de SDS por 1,0 gramo de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. Las moviidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular. **Vélez (1994).**

2.3.2. Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de exclusión o filtración en gel es una clase de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de dos o más sustancias en función de su tamaño molecular. Pérez (2004).

- **Mecanismo de la separación**

En la cromatografía de filtración en gel, se rellena una columna con partículas muy pequeñas de una sustancia inerte que contiene pequeños poros (éste es el gel). Para realizar la separación de moléculas de distinto tamaño, se aplica sobre el lecho del gel la muestra con estas moléculas. Al ir realizando la elución, las moléculas con un tamaño mayor que el de los poros del gel se moverán sólo en el espacio que queda entre las partículas, no sufriendo, por lo tanto, retraso en su recorrido a través de la columna (se dice que quedan excluidas del gel). Por el contrario, las moléculas con un tamaño menor que el de los poros difunden hacia el interior y el exterior de éstos, con mayor probabilidad cuanto menor es su tamaño molecular. Por lo tanto, las moléculas eluyen de la columna por orden de tamaño decreciente.

Se define el intervalo de fraccionamiento de un determinado tipo de gel como los valores extremos (máximo y mínimo) de pesos moleculares entre los cuales el gel tiene capacidad de separar.

El volumen de elución es el volumen necesario para eluir un compuesto de una columna.

Se llama volumen de exclusión de la columna al volumen al que eluyen las moléculas de tamaño superior al intervalo de fraccionamiento del gel. Corresponde a la suma del volumen de los huecos entre las partículas de gel. **Pérez (2004).**

- **Materiales para la filtración en gel**

Un gel es una red tridimensional cuya estructura está entrecruzada al azar. Los geles utilizados como tamiz molecular son polímeros hidrofílicos e insolubles cuyas cadenas poliméricas se entrecruzan hasta formar una red tridimensional. Los geles normalmente utilizados son de tres tipos: dextrano, agarosa y poliacrilamida.

El gel de dextrano (polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas bolitas) se comercializa con el nombre de Sephadex. Existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos entre 1 y 200 000 daltons. Estos geles se identifican por una denominación de G-10 hasta G-200, lo que se refiere a la capacidad de retención de agua del gel multiplicada por 10. **Pérez (2004).**

- **Aplicaciones de la filtración en gel**

Además de utilizarse para la separación de sustancias de distintos pesos moleculares o para la purificación de proteínas, se emplea para la determinación de pesos moleculares de proteínas.

Para una gran variedad de tipos de geles se ha comprobado que existe una relación lineal entre el volumen de elusión y el logaritmo del peso molecular de las proteínas. Por lo tanto, es suficiente medir el volumen de elusión de una proteína desconocida para llevarlo a una recta de calibrado (preparada con proteínas puras de peso molecular conocido) y deducir aproximadamente su peso molecular. **Pérez (2004)**.

2.3.3. Espectrofotometría de Proteínas

En espectroscopia se estudia la absorción y emisión de radiación electromagnética (luz) por la materia. En un sentido amplio, la espectroscopia trata con todas las interacciones de la radiación electromagnética con la materia, y por tanto, también incluye dispersión de luz y rotación del plano de rotación de la luz polarizada por sustancias ópticamente activas. **García-Segura (1996)**.

Las técnicas espectroscópicas se utilizan para conocer las características de la estructura de las moléculas.

Las transiciones entre estados electrónicos moleculares corresponden a absorción en las regiones del ultravioleta (U.V.) y visible:

U.V. lejano -> de 150 a 250 nm.

U.V. próximo -> de 250 a 350 nm.

Luz visible -> de 350 a 700 nm.

• • 00346

De estos el más utilizado en bioquímica es el U.V. próximo. Cuando la luz visible o la luz ultravioleta incide sobre un material, esta onda tiene asociado un campo magnético, que provoca la creación de dipolos transitorios. Si se aumenta la frecuencia de onda se aumenta la formación de dipolos en la muestra, hasta llegar a un valor límite a partir del cual se genera una transición electrónica. Lo que ocurre es que se produce absorción de esta radiación electromagnética por la muestra.

La fracción de la luz incidente absorbida por una solución a una longitud de onda determinada está relacionada con el espesor de la capa absorbente (denominado paso óptico) y con la concentración de la especie absorbente. Estas dos relaciones están combinadas en la ley de Lambert-Beer:

$$A = e \cdot c \cdot L$$

Ecuación obtenida de las siguientes:

$$A = \log (I_0 / I)$$

$$I = I_0 \cdot e^{-kl}$$

$$k = 2'303 \cdot e \cdot c$$

Siendo:

I_0 : la intensidad de la luz incidente.

- I : la intensidad de la luz transmitida.
- e : el coeficiente de absorción molar o absorptividad molar o coeficiente de extinción molar de la sustancia ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
- c : la concentración de la especie absorbente (M).
- L : el paso óptico de la muestra que absorbe luz (cm).
- A : la absorbancia (Adimensional).

La ley de Lambert-Beer supone que la luz incidente es paralela y monocromática y que las moléculas de disolvente y de soluto están orientadas al azar. En la expresión se observa que, a una capa absorbente de camino óptico fijo, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.

El coeficiente de absorción molar varía con la naturaleza del compuesto absorbente, el disolvente, la longitud de onda, y también con el pH si la especie absorbente de luz está en equilibrio con otra especie que tiene un espectro diferente debido a la ganancia o pérdida de protones.

Otro parámetro relacionado con la absorbancia es la transmitancia (T): es la fracción de radiación incidente transmitida a la longitud de onda λ .

$$T = (I_0 / I) \cdot 100$$

Las proteínas están constituidas por una serie de aminoácidos unidos entre sí mediante los denominados enlaces peptídicos. Esta unión covalente se

establece entre el grupo carboxilo en posición α de un residuo y el grupo α -amino del siguiente, de tal forma que en toda cadena polipeptídica siempre quedan libres dos extremos, amino-terminal y carboxilo-terminal. Además de su contribución al esqueleto covalente, cada aminoácido aporta su cadena lateral R particular. Algunas proteínas para ser funcionales necesitan la participación de grupos de naturaleza no proteica. Estos se conocen con el nombre de grupos prostéticos. Cuantitativamente hablando, el enlace peptídico es el cromóforo más importante de una proteína. Se trata de un cromóforo que absorbe en la región del ultravioleta lejano debido a las transiciones electrónicas del C=O del enlace peptídico.

En cuanto a las cadenas laterales de los aminoácidos proteicos, las bandas de absorción más significativas se encuentran en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre los 230 y 300 nm, es decir, dentro de la zona del uv-próximo. Concretamente, las cadenas laterales que absorben en este intervalo de frecuencias son las de los aminoácidos aromáticos.

El cromóforo cuantitativamente menos importante es la fenilalanina, por lo general presenta bandas diferenciadas, todas en torno a los 250-260 nm; como no absorbe por encima de 280 nm, su contribución global al espectro de la zona uv-próximo suele ser pequeña.

Como característica más destacable, el espectro de la tirosina presenta un máximo centrado a 275 nm, y un hombro sobre los 285 nm.

El caso del triptófano es mucho más complejo, pues la estructura de su cadena lateral es mucho más asimétrica y presenta un complicado sistema de electrones conjugados. Es el aminoácido que presenta el mayor coeficiente de extinción y el que absorbe mayores longitudes de onda; centrado sobre los 280 nm., se agrupan al menos tres bandas diferentes, correspondientes a tres transiciones electrónicas distintas. **García-Segura (1996).**

2.3.4. Determinación de concentración de proteínas

- **Método Lowry**

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.

Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso. **Pérez (2004)**.

2.3.5. Separación por Diálisis

Varias sustancias en solución que tengan pesos moleculares muy diferentes pueden separarse por difusión a través de una membrana semipermeable. Este proceso de separación se llama diálisis, la mayoría de las aplicaciones de la diálisis se reducen a escala del laboratorio o de investigaciones.

La diálisis, que depende de los flujos de la difusión relativos de los solutos, es más eficiente cuando se aplica a separar sustancias de bajo peso molecular en disolución de las sustancias de alto peso molecular.

La separación completa solo es posible si las últimas sustancias son demasiado grandes para pasar por los poros de la membrana.

El grado de separación o la proporción en que se recupera el soluto de peso molecular bajo determina la capacidad de la instalación de la diálisis. En la mayoría de los casos dicha capacidad es muy baja debido a la lenta velocidad de transferencia de las células dialíticas.

Si una solución acuosa que contiene sustancias de distintos pesos moleculares se mantiene separada de otra por medio de una membrana semipermeable, como celofán o papel pergaminizado, el gradiente de concentración que se establece en consecuencia hace que las sustancias se difundan a través de la membrana desde la solución concentrada hacia la más diluida a velocidades o flujos de transferencia variables. Al mismo tiempo, el agua pasará por la membrana en sentido opuesto al movimiento de los solutos.

De acuerdo a la ley de Fick de la difusión a través de líquidos, deducida por analogía de las leyes de transmisión de calor, cantidad de materia que se difunde por unidad de tiempo es proporcional al área del gradiente de concentración en sentido de la difusión.

Las proteínas son incapaces de atravesar membranas semipermeables, lo que posibilita separar a estas macromoléculas de otros constituyentes de menor peso molecular (aminoácidos, monosacáridos, urea, sales, iones, etc.) a través de los poros de las membranas semipermeables. A este fenómeno se le denomina diálisis. **Bornáz (1995)**.

2.3.6. Separación por precipitación

El principio básico de esta técnica es provocar una alteración de alguna propiedad del solvente original que promueva la precipitación de la sustancia, por ejemplo cambios en la fuerza iónica, pH, adición de solventes orgánicos

miscibles o de solutos inertes o polímeros así como la combinación de esos cambios con variaciones de la temperatura.

- **Precipitación Salina**

Las proteínas generalmente son solubles en condiciones fisiológicas a una fuerza iónica (m) entre 0,15 – 0,2 mol/l y pH neutro (la proteína presenta mayor número de grupos cargados).

La solubilidad es el resultado de: interacciones con el solvente acuoso; interacciones iónicas con las sales presentes; existencia de fuerzas electrostáticas repulsivas, entre moléculas o agregados moleculares pequeños y solubles con cargas idénticas.

Un incremento de la fuerza iónica, por la adición de sales neutras, provoca un aumento en la solubilidad de la proteína, ya que los grupos cargados de la proteína interactúan con los iones de la sal y se favorece un mayor número de zonas superficiales cargadas que provocan repulsiones moleculares. Este fenómeno se denomina solubilización por salado o "salt in".

Sin embargo la gran mayoría de las proteínas pueden mostrar una baja solubilidad a altas concentraciones salinas, lo cual se conoce como precipitación por salado o "salt out". Este fenómeno depende fundamentalmente de la hidrofobicidad de la proteína. Los iones provocan un incremento de la densidad de la carga y una mayor repulsión intermolecular, facilitándose la formación de la capa de solvatación. Después de la adición

de cierta cantidad de sal se establece una competencia entre los iones de la sal y los grupos cargados y polares de la proteína por las moléculas de agua y se afecta la capa de solvatación. Los grupos hidrófobos superficiales originan un ordenamiento de las moléculas de agua alrededor de estas zonas, dando como resultado un estado ordenado termodinámicamente inestable que lleva a la agregación y precipitación de la proteína. **Rendina (1974)**.

- **Precipitación con solventes orgánicos**

La adición de solventes orgánicos miscibles en agua, tales como etanol o acetona, disminuye la solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares en el agua de tal manera que precipitan de la disolución. El efecto principal es la disminución de la actividad del agua. El poder de solvatación del agua por la molécula hidrofílica cargada disminuye cuando la concentración del solvente orgánico aumenta y esto está determinado por una disminución en la constante dieléctrica del etanol ($D=24$) con respecto al agua ($D=80$). Esto trae como resultado un incremento en las fuerzas de atracción entre las moléculas proteicas, o sea que las moléculas de proteínas tienden a agregarse y precipitan. Es muy importante tener en cuenta la temperatura en estas precipitaciones con solventes orgánicos, ya que a temperaturas alrededor de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ comienzan a manifestarse efectos desnaturizantes. Esto se debe fundamentalmente a la afectación de las Interacciones hidrofóbicas

intramoleculares que estabilizan la estructura tridimensional nativa de la molécula. **Rendina (1974).**

- **Precipitación ácida**

Cuando las soluciones de proteínas se acidifican, adquieren una carga neta positiva. Las proteínas actúan como bases, y pueden formar sales con los ácidos o los aniones que se les añadan. Algunas de estas sales resultan insolubles. Se utilizan ácidos tanto para aislar proteínas como para quitarlas de las soluciones. La mayor parte de etapas de desproteinización se basan en este fenómeno, y se emplean a menudo sustancias como el ácido tricloroacético o el ácido perclórico. **Rendina (1974).**

2.3.7. Centrifugación

Esencialmente la centrifugación es un proceso que separa partículas que están en solución. Hay dos tipos de procesos de centrifugación: centrifugación preparativa, cuyo objeto es aislar partículas específicas, y centrifugación analítica, con la que se pretenden estimar propiedades físicas de alguna partícula en concreto: sus propiedades hidrodinámicas.

Cuando un rotor gira en una centrífuga, la fuerza centrífuga actúa sobre cada una de las partículas de la muestra. Cada partícula sedimentará proporcionalmente a la fuerza centrífuga aplicada. De igual manera también influirán sobre la sedimentación de cada partícula sus propiedades

físicas (forma, tamaño y densidad) así como la viscosidad de la solución en la que se encuentra la muestra.

Algunos de los principios básicos en la teoría de la sedimentación se derivan de la Ley de Stokes. Para simplificar el problema se suele considerar que las partículas a aislar en Biología son esferas; cuando éstas se encuentran en un campo gravitacional y alcanzan una velocidad constante, la fuerza neta sobre cada esfera es igual a la fuerza de resistencia que opone el líquido a su movimiento. En este caso particular de la ley de Stokes se comprueba qué:

- o La velocidad de sedimentación de cada partícula es proporcional a su tamaño.
- o La velocidad de sedimentación es proporcional a la densidad de la partícula y a la del medio.
- o La velocidad de sedimentación es nula cuando ambas densidades se igualan.
- o La velocidad de sedimentación disminuye al aumentar la viscosidad del medio.
- o La velocidad de sedimentación aumenta al aumentar el campo de fuerza.

La velocidad de sedimentación es útil para caracterizar partículas, pero en Bioquímica se emplea otra unidad: el coeficiente de sedimentación, que es la velocidad de sedimentación por unidad de fuerza centrífuga. **Amárta (2000).**

- **Métodos de separación en centrifugación preparativa**

- A) Centrifugación diferencial**

Es el método más común de separación, y es rara la purificación enzimática que no lo utiliza. En este método, el tubo de centrifuga se llena con una mezcla uniforme problema. Tras la centrifugación se obtienen dos fracciones: un pellet que contiene el material sedimentado y un sobrenadante con el material no sedimentado. El método es bastante inespecífico, y a priori no se puede saber si la partícula buscada quedará en el sobrenadante, en el pellet o repartido entre ambos; sin embargo es una técnica muy útil. **Amárta (2000).**

- ✓ **Precipitación de proteínas con sulfato amónico**

La precipitación salina es una técnica muy empleada en purificación enzimática; presenta un alto rendimiento pero muy poca selectividad, por lo que suele ser utilizada en las etapas iniciales del proceso. Las proteínas son polielectrolitos de superficie, por lo que al añadir al medio una sal, los iones de ésta neutralizan las cargas de las proteínas, llegándose a una situación en la que, por no presentar carga neta, las proteínas floculan. Para que la técnica tenga éxito es necesario recurrir a la centrifugación diferencial. **Amárta (2000).**

✓ **Tratamiento térmico**

Algunas proteínas son más termoestables que otras; si éste es el caso, un buen método para purificarlas es el tratamiento térmico. Las proteínas desnaturalizadas tienden a agregarse; una centrifugación diferencial ayudará a eliminarlas por sedimentación. **Amárta (2000).**

B) Centrifugación en gradiente de densidad

Este método es algo más complicado que la centrifugación diferencial, sin embargo presenta ventajas que compensan el trabajo añadido. La técnica no solo permite la separación de varios, si no todos, los componentes de la muestra, sino que también permite realizar medidas analíticas. El método de gradiente de densidad implica la utilización de un soporte fluido, cuya densidad aumenta desde la zona superior a la inferior. El gradiente se consigue con un soluto preferiblemente de baja masa molecular en un solvente en el que la muestra a analizar pueda ser suspendida. **Amárta (2000).**

2.3.8. Cristalización

Una solución consta de dos componentes: El disolvente y el soluto. Las soluciones pueden ser no-saturadas, saturadas y Sobre-saturadas.

Las soluciones no-saturadas tienen una concentración de soluto menor que las soluciones saturadas, y éstas a su vez tienen una concentración de soluto

menor que una solución sobresaturada. Por ejemplo: Supóngase que se agregan unos cuantos cristales de sal común a un vaso de agua. Esta será una solución no-saturada. Si se sigue añadiendo sal con agitación se llegará hasta un punto en el cual los cristales ya no se disuelven. Esta será una solución sobre-saturada. Si esta solución se deja reposar y se remueven los cristales que no se disolvieron, se obtendrá una solución saturada que contendrá la cantidad máxima de soluto que se puede disolver a la temperatura actual que llamaremos inicial. Si enfriamos la solución Saturada, con el tiempo se formarán cristales de sal, esto se debe a que la solubilidad de la sal en el agua depende de la temperatura y lo que fue una solución saturada a la temperatura inicial es ahora una solución sobre-saturada a la temperatura final.

Es importante recalcar que una solución sobresaturada es un sistema metaestable y que tenderá a estabilizarse, mientras que una solución saturada es un sistema estable.

Para efectuar la cristalización de un sólido hay que partir de una solución sobre-saturada. Existen varias formas de sobre-saturar una solución, una de ellas es el enfriamiento de la solución, otra consiste en eliminar parte del disolvente (por ejemplo: por evaporación) a fin de aumentar la concentración del soluto, otra forma consiste en añadir un tercer componente que tenga una mayor solubilidad que el componente que se desea cristalizar.

La rapidez del enfriamiento definirá el tamaño de los cristales resultantes. Un enfriamiento rápido producirá cristales pequeños, mientras que un enfriamiento lento producirá cristales grandes. **Pérez (2004)**.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias y en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

3.1. Materiales

3.1.1. Material vidrio y utensilios

- Buretas de 50 ml.
- Bolsas de celulosa para diálisis 10 ml.
- Espátulas.
- Fiolas 50, 100 ml.
- Gradillas
- Matras 250 ml.
- Magnetos.
- Placas petri.
- Pipetas 5, 10, 20 ml.
- Probetas de 50,100 ml.
- Tubos de ensayo de vidrio 14, 50 ml.
- Termómetro (-10 a 150 °C).
- Tubos de ensayo de plástico 14 ml.

- Viales 5, 10 ml.
- Vasos de precipitado 50, 100, 250 ml.

3.1.2. Equipos

- Agitador magnético marca Sigma.
- Aparato kjeldahl.
- Baño maría GLF.
- Balanza analítica Metler, modelo ME – 33515.
- Centrífuga refrigerada Hettich Universal 32R.
- Cocina eléctrica.
- Computadora Pentium IV (Intel).
- Desecador.
- Equipo pH – metro Xplorer PS-2000.
- Estufa Graduada, Memert.
- Extractor Soxhlet.
- Equipo de electroforesis vertical SIGMA-ALDRICH.
- Equipo de cromatografía filtración en Gel.
- Espectrofotómetro UV-Visible UNICO Uv-2102PC.
- Espectrofotómetro Visible HACH DR-2000.
- Fuente de Poder SIGMA-ALDRICH techware PS 251-2.
- Frigider.
- Mufia 450 – 600 grados Celsius.

3.1.3. Reactivos

- Ácido etilendiaminotetracético 99 % pureza (EDTA).
- Ácido clorhídrico 1, 2, 3 N.
- Acetona.
- Ácido Tricloroacético 10 %.
- Acrilamida 99 % pureza.
- Azul de Bromofenol 98 % pureza.
- Azul Dextrano 99 % pureza.
- Ácido Acético 99 % pureza .
- Azul Brillante de Coomasie R250.
- Alcohol Isopropílico.
- Albúmina sérica bovina 98 % pureza.
- Bisacrilamida 99 % pureza.
- Citrato de sodio 99 % pureza.
- Caprilato de Sodio 0,04 M.
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) 99 % pureza.
- Etanol 96 % pureza.
- Éter etílico 99 % pureza.
- Glicerol 87 % pureza.
- Glicina 1,5 %.
- Hexano 99 % pureza.
- Hidróxido de Sodio 99 % pureza.

- 2-Mercaptoetanol 99 % pureza.
- Metanol QP.
- N,N,N,N, Tetrametiletilendiamino (TEMED) 99 % pureza.
- Oxalato de amonio 99 % pureza.
- Persulfato de amonio (APS) 99 % pureza.
- Rojo de fenol 98 % pureza.
- Sephadex G-75 99 % pureza.
- Sulfato de amonio (solución saturada).
- S Tris Base 99 % pureza.

3.2. Métodos de Investigación

3.2.1. Lugar de ejecución

La presente Investigación se realizó en los Laboratorios de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias y en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

3.2.2. Materia prima

Se utilizó como materia prima sangre bovina obtenida de animales sanos, según certificación del Médico Veterinario, procedente del Camal Municipal de Calana - Tacna.

3.2.3. Procedimiento de investigación

3.2.3.1. Materia prima

Se empleó sangre bovina obtenida de animales sanos, recolectada en el Camal Municipal de Calana – Tacna. Se obtuvo al momento del beneficio del animal, en botellas de plástico de 1 litro de capacidad; las muestras se procesaron luego de 30 minutos de obtenerlas.

3.2.3.2. Estabilización

En esta etapa de estabilización se le adiciona a la sangre un anticoagulante con la finalidad de que esta no siga su ciclo normal y llegue a la coagulación. Para esta parte de la investigación se trabajó con dos anticoagulantes, con el objetivo de hallar al de mejor comportamiento (mayor rendimiento en plasma y menor grado de hemólisis); el primer anticoagulante utilizado fue el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y el segundo una mezcla de citrato de sodio y oxalato de amonio en relación 1:1; estos dos anticoagulantes se utilizaron al 0,4 % de concentración final utilizándolos en estado sólido.

En la figura nº 7, se observa el diseño experimental del trabajo de investigación.

3.2.3.3. Métodos Experimentales

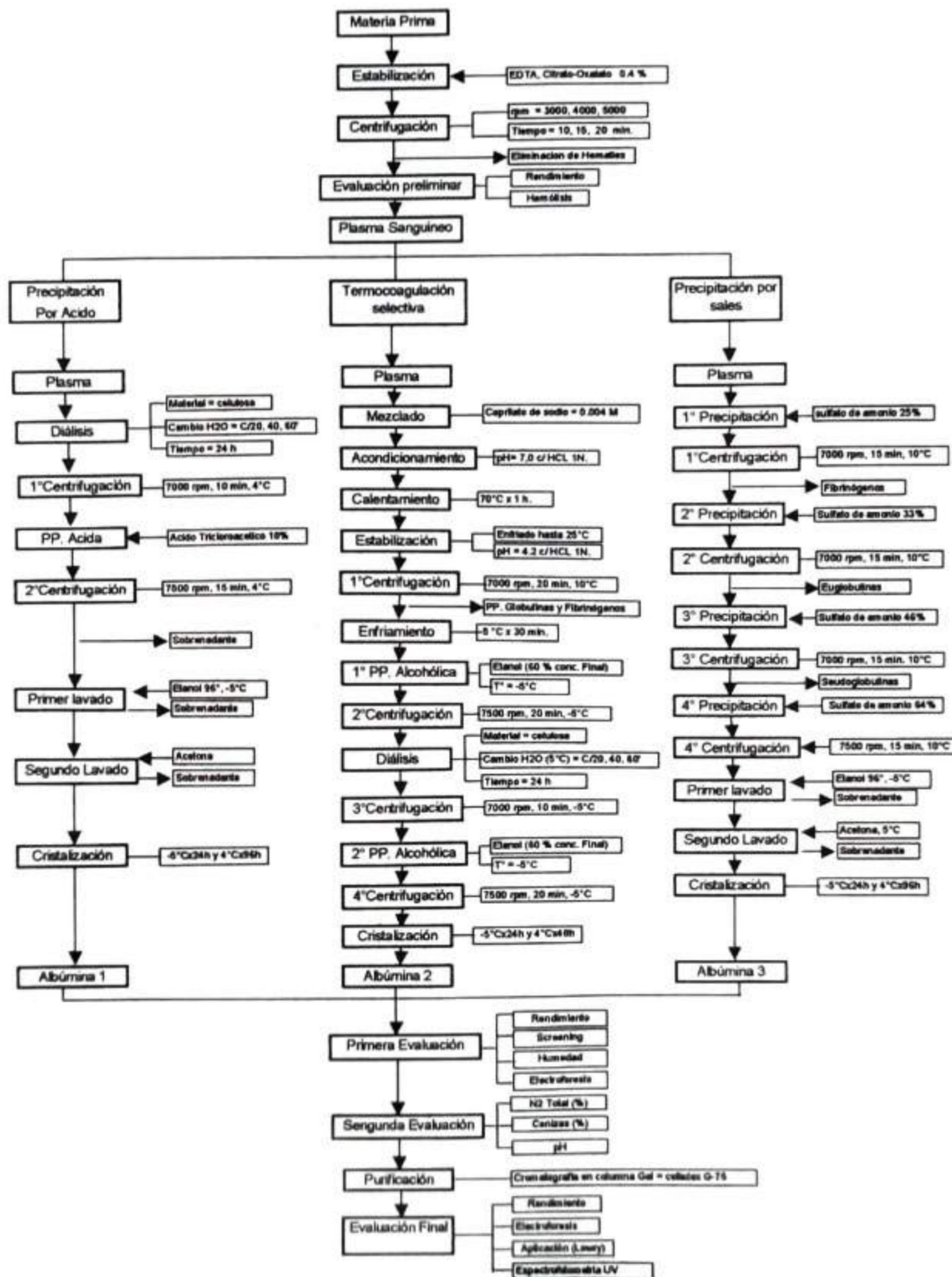


FIGURA Nº 7 : FLUJOGRAMA EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.

FUENTE : ELABORACIÓN PROPIA

3.2.3.4. Transporte

El transporte de la materia prima se realizó en un envase térmicamente aislado, conteniendo hielo para mantener la temperatura y evitar la desnaturalización por calor de las proteínas presentes en la sangre, por la influencia de la temperatura.

3.2.3.5. Centrifugación

Este proceso de centrifugación se realizó con el objetivo de separar el plasma de los corpúsculos rojos de la sangre, utilizando para el proceso una centrífuga digital refrigerada.

La temperatura de trabajo fue de 4 °C, para evitar la desnaturalización de las proteínas. En el diseño experimental planteado en la figura nº 7 se plantea un análisis preliminar de 3 variables independientes que son las siguientes:

- 1.- Velocidad de centrifugación (3000, 4000 , 5000) rpm.
- 2.- Tiempo de centrifugación (10, 15, 20) minutos.
- 3.- Tipo de anticoagulante (EDTA, Citrato de sodio – Oxalato de amonio 1:1) 0,4%.

Para esta etapa preliminar se evaluaron las variables respuestas que son: el rendimiento y el grado de hemólisis en función a la absorbancia.

Las muestras de sangre se trabajaron en relación a un volumen final de 50 ml por tratamiento realizado.

El volumen de plasma se halló midiéndola en una probeta, y posteriormente se calculó el rendimiento.

La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro, en el espectro visible con una longitud de onda de 540 nm que es a esta longitud de onda donde se mide la máxima absorbancia de la hemoglobina.

Según el diseño experimental en la figura nº 7, al finalizar la etapa de centrifugación el plasma es sometido a tres métodos diferentes de aislamiento de albúmina sérica bovina, los cuales se describirán a continuación en forma independiente para cada método.

Se tomó también el valor del pH del plasma obtenido con los anticoagulantes, con la utilización del EDTA se obtuvo un plasma con un valor de pH igual a 7,85; y con la utilización de citrato de sodio – oxalato de amonio se obtuvo un plasma con un valor de pH igual a 8,05.

3.2.3.6. Delineamiento Experimental

Para estudiar los efectos de la velocidad de centrifugación (rpm) y el tiempo de centrifugado (minutos), sobre el rendimiento y grado de hemólisis; fue utilizado un delineamiento factorial (Box y Wilson, 1951). Las variables fueron establecidas en tres niveles codificados como: -1, 0, +1; los valores reales correspondientes a estos niveles aparecen en el cuadro n° 4.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico Statistica v. 5.0.

CUADRO N° 4 : NIVELES DE LAS VARIABLES INDEPENDIENTES ESTUDIADAS DURANTE LA DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO Y GRADO DE HEMÓLISIS.

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
X1	3000	4000	5000
X2	10	15	20

FUENTE : ELABORACIÓN PROPIA

X1= (rpm) velocidad de centrifugación.

X2= (minutos) tiempo de centrifugación.

Los rangos de variación entre el limite superior e inferior fueron establecidos a partir de pruebas preliminares.

En el cuadro n° 5 se presentan los valores codificados y reales del delineamiento factorial. Las variables dependientes estudiadas fueron: el rendimiento y el grado de hemólisis expresada como absorbancia.

CUADRO N° 5 : DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO.

Tratamiento	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1	0
6	+1	0
7	0	-1
8	0	+1
9	0	0
10	0	0
11	0	0

FUENTE : ELABORACIÓN PROPIA

3.2.3.7. Optimización del proceso en función de las variables investigadas

Con la finalidad de identificar el área experimental que nos permita maximizar las propiedades estudiadas, se estableció una nueva variable dependiente, rendimiento / absorbancia (LOG_R), basado en los modelos desarrollados por Silva Borsato (1985). La expresión matemática de esta respuesta global fue: **LOG_R = Rend. / Abs.**

Para que las respuestas sean situadas en el mismo rango de variación, fue utilizado el logaritmo de la relación. Posteriormente, los resultados fueron evaluados por análisis de regresión para desarrollar un modelo matemático de primero o segundo orden. Donde el máximo rendimiento y la mínima hemólisis sean obtenidas simultáneamente.

3.2.3.8. Métodos de purificación de albúmina sérica bovina

3.2.3.8.1. Precipitación por ácido

- **Diálisis**

Obtenido el plasma, se depositaron 30 ml de este en tres bolsas de diálisis, cuyas características son: membrana de celulosa, tamaño de poro 10 Kda (1da = 1g/mol), capacidad 12 ml, longitud 12 cm, diámetro 1,2 cm. Luego se suspenden las tres bolsas en agua destilada fría a 5 °C, contenida en un vaso de precipitación de 1,0 l de capacidad, y a la vez cubierto por una lamina de aluminio; esto con la finalidad de evitar la contaminación con impurezas del medio ambiente.

Inmediatamente se coloca un equipo de agitación magnética, que tiene como finalidad acelerar y uniformizar el proceso de la diálisis. Como se observa en la figura del anexo XV.

El proceso dura 24 horas, en las cuales se realizan cuatro cambios de agua, el primero a los 20 minutos, el segundo a los 40 minutos, el tercero a los 60 minutos y el último 60 minutos antes de que termine el proceso.

Al finalizar el proceso se observa un precipitado color beige, la cuales pertenecen al grupo de las globulinas, proteínas insolubles en agua.

- **Primera centrifugación**

Se efectuó en una centrifuga refrigerada digital marca Hettich Universal 32R.

Se realizó a una velocidad de 7000 rpm, con un tiempo de 10 minutos, y a una temperatura de 4 °C.

Después de la centrifugación se visualiza la separación del plasma en dos fases, el precipitado (sólido) de color beige y el sobrenadante (líquido) de color amarillento.

Se separa el precipitado, que correspondería a las globulinas y fibrinógeno; y se continúa el procedimiento con el sobrenadante en la cual se encuentra la albúmina.

- **Precipitación ácida**

En esta etapa se le adicionó 24 ml de ácido tricloroacético al 10 % de concentración, con la finalidad de precipitar las albúminas presentes en la solución.

Se observó una aparición de un precipitado espeso y de color blanquecino.

- **Segunda centrifugación**

Se realizó con a finalidad de separar el precipitado del sobrenadante, las condiciones fueron las siguientes: velocidad de centrifugación 7500 rpm, tiempo de centrifugado de 15 minutos, y a una temperatura de 4 °C.

En esta etapa se elimina el sobrenadante y se prosigue el trabajo con el precipitado.

- **Primer Lavado**

Se realizó con etanol al 96 %, a una temperatura de -5 °C, se realizó una agitación manual a esta mezcla por espacio de 10 minutos.

Se efectúa con las siguientes finalidades: Eliminar el agua presente en el precipitado, para disminuir el tiempo de la cristalización; y la otra finalidad es de eliminar las impurezas que estén presentes en el precipitado.

- **Segundo lavado**

Tiene por finalidad eliminar los restos de etanol utilizado en el primer lavado y se realiza también con la finalidad de acelerar la cristalización, se utiliza acetona comercial a una temperatura de -5 °C.

- **Cristalización**

Finalizado el proceso del segundo lavado; se realizó una cristalización de la albúmina, llevado a cabo en un frigorífico, manteniéndolo en la parte del congelador por un tiempo de 1 día a una temperatura de -5°C , y luego en el área de refrigeración por un espacio de 4 días a una temperatura de 4°C , consiguiendo de esta manera la reducción parcial del agua presente en el producto.

3.2.3.8.2. Precipitación por sales

- **Primera precipitación**

Para este método se utilizaron 30 ml. de plasma como materia prima inicial.

En esta etapa de precipitación se le adiciona al plasma una solución saturada de sulfato de amonio, con la finalidad de llevar toda la solución a una saturación final de 25 %, y de esta manera poder precipitar el Fibrinógeno presente en el plasma. Para obtener una saturación deseada se utiliza la siguiente fórmula:

$$Y = (V1 (S2 - S1)) / (1 - S2)$$

Donde:

- Y = Volumen en ml. de sulfato de amonio a saturación que debe añadirse a V1.
- V1 = Volumen inicial de la solución cuya saturación es S1.
- S1 = Saturación de la solución inicial.
- S2 = Saturación buscada.

Esta precipitación se realizó a una temperatura de 10 °C, y se efectuó en vaso de precipitación de 250 ml de capacidad.

- **Primera centrifugación**

Se efectuó en una centrífuga refrigerada digital, a una velocidad de 7000 rpm, con un tiempo de centrifugado de 15 minutos, y una temperatura de 10 °C.

Terminado este proceso se eliminó el precipitado correspondiente al fibrinógeno, y se prosiguió con el siguiente proceso, teniendo el sobrenadante como materia de trabajo.

- **Segunda precipitación**

Se midió el volumen del sobrenadante proveniente de la primera centrifugación; que nos sirve para realizar los cálculos para llevar la solución anterior de 25 % a una nueva de 33 % de concentración final de sulfato de amonio. El volumen de solución saturada a

adicionar a la nueva solución de 25 %, es obtenido con la fórmula anteriormente mencionada.

La finalidad de esta segunda precipitación es de hacer precipitar a las euglobulinas presentes en el plasma.

- **Segunda centrifugación**

Se realizó a una velocidad de centrifugación de 7000 rpm, con un tiempo de centrifugado 15 minutos y una temperatura de 10 °C. Tiene como finalidad separar las euglobulinas precipitadas del sobrenadante.

- **Tercera precipitación**

Al sobrenadante obtenido de la segunda centrifugación, que tiene una concentración de 33 % de sulfato de amonio, se le prosigue adicionando volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración final de 46 %, con la finalidad de precipitar las seudoglobulinas presentes en el sobrenadante, la cual se realizó utilizando la misma metodología anteriormente señalada.

- **Tercera centrifugación**

Se efectuó con la finalidad de separar las seudoglobulinas precipitadas en el proceso anterior; y se realizó a una velocidad de

7000 rpm, con un tiempo de 15 minutos, y una temperatura de 10 °C.

- **Cuarta precipitación**

Se realizó con la finalidad de precipitar las albúminas presentes en el sobrenadante, obtenido en el proceso anterior. Se consigue incrementando la concentración hasta un 64 % de sulfato de amonio, se realiza siguiendo la misma metodología anterior.

- **Cuarta centrifugación**

Se realizó a una velocidad de 7500 rpm, con un tiempo de 15 minutos, y una temperatura de 10 °C. Con la finalidad de conseguir la separación de las albúminas precipitadas del sobrenadante, que posteriormente se eliminó.

- **Primer lavado**

Se efectuó con la finalidad de eliminar el agua presente en el precipitado, para poder conseguir una cristalización en un menor tiempo. Para este propósito se utilizó etanol comercial al 96 % a una temperatura de -5 °C, se realizó una agitación manual a esta mezcla por espacio de 10 minutos.

- **Segundo lavado**

El segundo lavado se realizó con la finalidad de arrastrar los restos de agua y alcohol presentes en el precipitado, también con la finalidad de conseguir mejores tiempos de cristalización, se utilizó acetona comercial a una temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Cristalización**

La cristalización se realizó con la finalidad de conseguir un secado de la albúmina, y se efectuó por espacio de 1 día a una temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, y luego cuatro días a una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.8.3. Termocoagulación selectiva

- **Mezclado**

Esta etapa de mezclado se realizó utilizando como materia prima 30 ml. de plasma bovino, la cual fue mezclada con un volumen igual de una solución de caprilato de sodio al 0,04 M, esto con la finalidad de mantener estable a la albúmina en los tratamientos posteriores. Se realizó también una medida del pH del plasma antes de proceder al mezclado el cual fue de 8,0 y después del mezclado el pH fue de 7,6.

- **Acondicionamiento**

El acondicionamiento se realizó añadiendo ácido clorhídrico 1N. a la mezcla de plasma y caprilato de sodio, para ajustar el pH a 7,0; utilizando para este efecto una micropipeta pasteur y un pH-metro digital marca X-Plorer Pasport.

- **Calentamiento**

El calentamiento se realizó en un equipo de baño maría automático, marca GLF, a una temperatura de 70 °C, y por un tiempo de una hora; la muestra estuvo contenida dentro de un matraz de 250 ml de capacidad, sujeta por un soporte universal. En este proceso se busca la desnaturalización y precipitación de todas las proteínas, excepto la albúmina que al interactuar con el caprilato de sodio, el cual se une a la molécula de albúmina en su tercer dominio y permanece estable a 70 °C, sin ocasionar su precipitación y desnaturalización.

- **Estabilización**

Después de la etapa de calentamiento, se procedió a estabilizar la muestra, se bajó la temperatura hasta llegar a 25 °C; el enfriamiento

se realizó a temperatura ambiente, el tiempo para alcanzar la temperatura deseada fue de 40 minutos aproximadamente.

En esta etapa también se efectuó una corrección del pH; el pH medido a la temperatura de 25 °C fue igual a 7,9; el cual se disminuyó con la adición de ácido clorhídrico 1N hasta alcanzar un pH igual a 4,2.

- **Primera centrifugación**

Se efectuó a una velocidad 7000 rpm, a una temperatura de 10 °C, y con un tiempo de 20 minutos. Se utilizó una centrífuga refrigerada digital de marca Hettich Universal 32R.

Se realizó con la finalidad de separar las globulinas y fibrinógenos, desnaturalizadas que precipitan por la acción del calor y el pH.

Se eliminó el precipitado de color beige, y se siguió el procedimiento con el sobrenadante, el cual se observó como una sustancia transparente.

- **Enfriamiento**

Se realizó con la finalidad de alcanzar una temperatura de -5 °C, la cual es ideal para mantener estable las proteínas y prevenir su desnaturalización. Se llevo a cabo en la centrífuga refrigerada.

- **Primera precipitación alcohólica:**

Se realizó con la finalidad de precipitar la albúmina presente en la solución, se efectuó a una temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizándose etanol comercial de 96°; y el volumen a añadir se determinó mediante el Cuadrado de Pearson, cuya fórmula obtenida es la siguiente:

$$\text{Etanol } 96^{\circ} \text{ (ml)} = (60/36) * (\text{ ml de Solución Proteínica })$$

- **Segunda Centrifugación**

Se realizó para separar la albúmina precipitada del sobrenadante, se utilizó una velocidad de 7500 rpm, un tiempo de 20 minutos y una temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Diálisis**

Se efectuó en una bolsa, membrana de celulosa de 14 ml de capacidad, 10 Kda de tamaño de poro, 12 cm longitud, 1,2 cm diámetro. Se mantuvo bajo agitación magnética en un vaso de precipitado conteniendo agua destilada, durante 24 horas; realizándose cuatro cambios de agua a una temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- **Tercera centrifugación**

Se realizó con la finalidad de eliminar los residuos de globulinas y otras sustancias extrañas precipitadas en la diálisis, se efectuó con

una velocidad de centrifugación de 7000 rpm por un espacio de 10 minutos y a una temperatura de -5°C .

- **Segunda precipitación alcohólica**

Luego de realizada la diálisis, se procedió a efectuar la segunda precipitación alcohólica con etanol de 96°, a una temperatura de -5°C , el volumen de etanol a adicionar a la solución proteínica se determinó con el cuadrado de Pearson hasta llevar a una concentración final de 60 % de etanol.

- **Cuarta centrifugación**

Se realizó a una velocidad de 7500 rpm, un tiempo de 20 minutos, y una temperatura de -5°C . Tiene por finalidad separar las albúminas precipitadas en el proceso anterior.

- **Críсталización**

Se efectuó en una placa de material vidrio, la cual se mantuvo a una temperatura de -5°C por espacio de un día, luego se mantuvo dos días a una temperatura de 4°C . Con la finalidad de eliminar el agua, el alcohol y la acetona residual presentes en el producto.

3.2.4. Métodos analíticos de control

3.2.4.1. Métodos analíticos en la materia prima

3.2.4.1.1. Determinación de humedad

Se utilizó el método de la estufa 105 °C por pérdida de peso según la AOAC (Asociation of Oficial Agicultural Chemical, 1984).

3.2.4.1.2. Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Kjeldahl, y como factor a multiplicar al % de nitrógeno 6,25 según la AOAC, (1984).

3.2.4.1.3. Determinación de lípidos

Se utilizó el método Soxhlet, utilizando como solvente éter de petróleo, siguiendo la metodología de la AOAC, (1984).

3.2.4.1.4. Determinación de cenizas

En su determinación se utilizó el método de calcinación, según la metodología de la AOAC, (1984).

3.2.4.1.5. Determinación de carbohidratos

Se determinó por diferencia porcentual de la suma de los demás componentes.

3.2.4.2. Métodos analíticos durante el proceso

3.2.4.2.1. Determinación de presencia de otras proteínas

Se determinó por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS – PAGE, siguiendo la metodología del manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN del Instituto Nacional de Salud, (2003).

3.2.4.2.2. Determinación de pureza de proteínas

Se realizó por el método de espectrofotometría UV, por comparación con un patrón de albúmina sérica bovina de pureza conocida, siguiendo la metodología tradicional. Freifelder, (1999). Y utilizando para esta prueba el software Unico UV 2102 PC Spectrofotometer.

3.2.4.3. Métodos analíticos para el producto final

3.2.4.3.1. Determinación de pureza de proteínas

Se realizó por el método descrito en el punto 3.2.4.2.2.

3.2.4.3.2. Determinación de presencia de otras proteínas

Se determinó por el método indicado en el punto 3.2.4.2.1.

3.2.4.3.3. Determinación de humedad

Se utilizó el método indicado en el punto 3.2.4.1.1.

3.2.4.3.4. Determinación de nitrógeno total

Se realizó por el método descrito en el punto 3.2.4.1.2. sin multiplicar por el factor 6,25.

3.2.4.3.5. Determinación de cenizas

En su determinación se utilizó el método indicado en el punto 3.2.4.1.4.

3.2.5. Primera evaluación

La finalidad de esta primera evaluación, es de descartar aquellos métodos que se encuentren fuera de los intereses de la investigación.

Se realizaron las siguientes pruebas a las albúminas obtenidas por los tres métodos diferentes. A este nivel se realizó un análisis estadístico del tipo diseño completamente aleatorizado unifactorial, para determinar cual de los tres métodos es el que reporta albúmina sérica bovina con las características de interés más significativo y así poder continuar el proceso con la purificación por cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75.

3.2.5.1. Rendimiento

Se realizó al culminar la etapa de cristalización de cada método de obtención de albúmina, se procedió a pesar el total de albúmina obtenida y se representa en gramos de proteína por litro de plasma (g/l).

3.2.5.2. Humedad

Se efectuó para determinar el porcentaje de agua presente en la muestra y de esta manera no afecte en los valores del rendimiento. Se determinó siguiendo la metodología de pérdida de peso y se expresa en % (p/p).

3.2.5.3. Barrido espectrofotométrico (Screening)

Se realizó a cada una de las muestras obtenidas de los tres diferentes métodos. Se prepararon muestras de albúmina 1 mg/ml de agua destilada, las cuales fueron colocadas en una cubeta de cuarzo de 3 ml de capacidad, y analizadas con un barrido espectrofotométrico desde una longitud de onda mínimo de 200 nm hasta un máximo de 400 nm, obteniendo lecturas cada 0,1 nm, y tomando en cuenta que la máxima longitud de onda se encuentra a 279 nm en el caso de la albúmina sérica bovina.

Las muestras se compararon con el screening de un patrón de albúmina al 98 % de pureza obtenido de Sigma Aldrich. Las cubetas utilizadas fueron de material de cuarzo especiales para el espectro ultravioleta; el equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV-Visible marca Unico; conectado a una computadora modelo Intel (R)-Pentium IV; en donde por medio de un software se obtienen los datos y las figuras requeridas.

3.2.5.4. Electroforesis

Se efectuó con la finalidad de determinar una comparación entre los pesos moleculares de las albúminas, y para determinar la presencia de otras proteínas contaminantes, estas fueron evaluadas y comparadas con la albúmina patrón de 98 % de pureza marca Sigma Aldrich.

Esta electroforesis es conocida como PAGE-SDS (electroforesis en gel de poliacrilamida), y sus características fueron las siguientes:

Se elaboró un gel doble en placa de vidrio, el primero ubicado en la parte superior, preparado al 6 % de concentración, conocido como gel de empacamiento, que tiene como finalidad agrupar las proteínas en una línea vertical; y el segundo gel ubicado en la parte inferior de la placa, preparado al 12 % de concentración, conocido como gel de separación, que tiene como finalidad separar las proteínas de acuerdo a sus pesos moleculares.

El buffer que se utilizó para la corrida electroforética fue el buffer Tris-Glicina-SDS.

Las muestras se prepararon partiendo de una dilución de 1 mg/ml, de las cuales se utilizaron 60 μ l de muestra y se mezclaron con 20 μ l de buffer muestra. Se llevó a calentamiento a 100 °C por un tiempo de 5 minutos, luego se centrifugo a 1200 rpm por un tiempo de 10 segundos realizado en una micro-centrífuga de marca (Eppendorf Centrifuge 5410), luego se

procedió a enfriar la muestra a 5 °C. Para realizar la electroforesis se adicionó 20 µl de esta mezcla a cada pozo del gel.

Como marcador de la corrida de las muestras se utilizó el colorante azul de bromofenol.

La electroforesis se efectuó a 160 voltios, 30 miliamperios y con un tiempo de 4 horas y 30 minutos.

Después de finalizado el corrido electroforético se procedió a retirar el gel para proceder a colorearlo sumergiéndolo en un recipiente con el colorante azul de coomassie, por espacio de 2 horas, esto con la finalidad de colorear a las proteínas presentes en el gel. Luego de este paso se procedió a la decoloración para apreciar mejor el teñido de las proteínas, esto se realizó con dos tipos de solución decolorante; la primera decoloración, inmersión en una solución de decoloración rápida por un tiempo de 15 minutos, y el segundo, inmersión en solución de decoloración lenta por un tiempo de 30 minutos.

3.2.6. Segunda evaluación

La finalidad de esta segunda evaluación es de determinar las características particulares de la albúmina obtenida, y de esta manera compararla con el patrón de Sigma Aldrich.

3.2.6.1. Determinación de Cenizas

En su determinación se utilizó el método por calcinación, según la metodología de la AOAC, (1984).

3.2.6.2. Determinación de Nitrógeno Total

Se realizó por el método semimicro kjeldahl, según la AOAC (1984).

3.2.6.3. Determinación de pH

Se realizó formulando una solución al 1% de proteína en cloruro de sodio al 0,15 M; a la cual se le tomó la medida del pH. Conforme indica el certificado de análisis obtenido de Sigma Aldrich.

3.2.7. Purificación (Cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75)

Se utilizó la técnica de cromatografía de filtración en gel, en columna de vidrio, de 100 cm de longitud y 1 cm de diámetro, conteniendo sephadex G-75 hidratado, como fase estacionaria sólida y buffer fosfato (PBS) al 0,04 M con pH de 7,0 como fase móvil líquida. Como marcadores de pesos

moleculares se utilizaron, el azul dextrano de 2 000 000 g/mol y el rojo de fenol de 354,8 g/mol. El flujo de elusión fue de 1 ml/5min, colectados en tubos de plástico (ependorf) de 1,5 ml de capacidad para su posterior lectura en el espectrofotómetro UV-Visible.

3.2.8. Evaluación final

Se realizó con la finalidad de evaluar el proceso de purificación por cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75, y de esta manera determinar el grado de purificación que se alcanzó.

3.2.8.1. Barrido espectrofotométrico (Screening)

Se efectuó al terminar la purificación por cromatografía de filtración en gel para establecer una comparación con la muestra antes de la purificación y con el patrón.

El screening se realizó siguiendo las mismas condiciones anteriores para todas las muestras y patrones.

3.2.8.2. Electroforesis

Se realizó para determinar en que grado se había mejorado la purificación por cromatografía y poder determinar la presencia de otras proteínas contaminantes o sustancias extrañas.

El procedimiento es el mismo que en la primera evaluación para evitar errores en la interpretación de los resultados.

3.2.8.3. Aplicación

Para comprobar todos los análisis antes descritos se procedió a realizar una prueba comparativa para determinación de concentración de proteínas por el método de Lowry, entre la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva y la albúmina patrón de marca Sigma Aldrich. Se realizaron dos curvas patrón para cada una de las albúminas teniendo como resumen el cuadro nº 6, para la obtención de los datos con la cual se construye la curva de calibración.

CUADRO N° 6 : CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PROTEÍNAS (método Lowry).

Tubo N°	Agua	Patrón (1mg/ml)	React.C	Folin dil	Abs.580nm
1	1,0 ml	–	5,0 ml	0,5 ml	
2	0,9 ml	0,1 ml	5,0 ml	0,5 ml	
3	0,8 ml	0,2 ml	5,0 ml	0,5 ml	
4	0,7 ml	0,3 ml	5,0 ml	0,5 ml	
5	0,6 ml	0,4 ml	5,0 ml	0,5 ml	

FUENTE : PEREZ, (2004)

Luego de determinada cada una de las dos curvas de calibración para ambas albúminas, se hallaron sus respectivas desviaciones estándar, error promedio y coeficiente de determinación.

3.2.8.4. Rendimiento

Se realizó un análisis del rendimiento al finalizar la purificación, para verificar cuanto de proteína pura se puede recuperar después de una cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75. Para lo cual se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Se determinó la cantidad en miligramos de albúmina sérica bovina por medio de la concentración de muestra inicial a adicionar a la columna cromatográfica.
- 2) Después de recoger los volúmenes de elución, se tabularon los datos de volúmenes de elución con las absorbancias respectivas correspondiente a cada uno de los volúmenes eluidos.
- 3) Se tomaron los volúmenes de elución correspondientes al pico de la albúmina sérica bovina y se realizó la prueba de Lowry, para determinar la concentración de proteína purificada en miligramos por mililitro.
- 4) Se halló la cantidad de albúmina sérica bovina obtenida después de la purificación y se determinó el rendimiento del proceso.

IV. HIPÓTESIS E IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

4.1. Formulación de la hipótesis

Para el desarrollo de la tesis se planteó la siguiente hipótesis " Es factible la obtención de albúmina sérica bovina de uso reactivo y de calidad comercial a partir de sangre bovina "

4.2. Identificación de las variables e indicadores

4.2.1. Ensayo preliminar

4.2.1.1. Variables independientes

En este diseño preliminar se consideró 3 variables independientes:

- Velocidad de centrifugación con sus niveles 3000, 4000 y 5000 rpm.
- Tiempo de centrifugado con sus niveles 10, 15 y 20 minutos.
- Tipo de anticoagulante utilizado al 0,4 %, el primero etilendiaminotetracético (EDTA) y el segundo mezcla de citrato de sodio y oxalato de amonio en relación 1:1.

4.2.1.2. Variables dependientes

Se consideraron las siguientes como variables dependientes en el diseño:

- El rendimiento en plasma %.
- Grado de hemólisis, estudiada en base al nivel de absorbancia.

4.2.2. Procedimiento final

En esta parte del trabajo de investigación se evaluaron independientemente cada uno de los tres métodos de purificación de albúmina sérica bovina, las cuales son: el método de precipitación por ácido, el método de termocoagulación selectiva y el método de precipitación por sales.

A estos tres métodos de purificación se le evaluaron: el contenido de humedad (%), el rendimiento en proteína (%), y la absorbancia mediante un barrido espectrofotométrico (screening).

Es importante mencionar que separadamente de las pruebas cuantitativas mencionadas; existe una prueba de gran importancia para el estudio y corroboración de los comportamientos de los datos obtenidos, esta es la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS), prueba cualitativa que se le realizó a cada uno de los métodos de purificación. Y que servirá para identificar visualmente la presencia o ausencia de las proteínas de interés en esta investigación.

4.2.3. Indicadores

En el cuadro n° 7 se muestran los valores de los indicadores, que fueron seleccionados a partir del certificado de análisis que se realizan a la albúmina bovina marca Sigma Aldrich; que se muestra en el anexo XIX.

CUADRO N° 7 : INDICADORES PARA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES
pH (1% en 0,15 M NaCl)	5,2 – 7,0
Absorbancia Óptica (1 mg/ml a 279 nm)	0,667
Nitrógeno Total	14,5 – 16,5 %
Humedad	< 5%
Ceniza	< 1%

FUENTE: SIGMA Aldrich

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Resultados del análisis de la materia prima

5.1.1. Análisis químico de la materia prima

Se realizó un análisis proximal de la sangre obtenida de tres animales diferentes, las muestras se analizaron por duplicado, y los resultados fueron expresados en base seca; los resultados se expresan en el cuadro n° 8.

Los análisis se realizaron completamente en el Laboratorio de Análisis de los Alimentos de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

CUADRO N° 8 : ANÁLISIS PROXIMAL DE LA SANGRE BOVINA.

Componente	Cantidad (%)
Humedad ⁽¹⁾	80,2
Proteínas ⁽²⁾	18,0
Grasa	0,3
Ceniza	0,8
Carbohidratos ⁽³⁾	0,7

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

(1) Determinada en estufa (105 °C)

(2) N x 6,25

(3) Por diferencia

Los resultados se contrastaron con los obtenidos por otros investigadores (Madrid A, 1999; Cheffel S, 1989) quienes reportaron datos de 80,0 % y 80,8 %, respectivamente para la humedad; 18,6 % y 17,0 % para compuestos proteicos; 0,2 % de contenido de grasas; 0,9 % de contenido de cenizas; 0,8

% y 1,1 % respectivamente para el valor de carbohidratos. Se puede observar que los valores obtenidos en este estudio están dentro de los valores aportados por los investigadores y en algunos casos se encuentran variaciones mínimas permisibles.

Las diferencias observadas por diferentes autores pone en evidencia que no siempre puede haber concordancia entre los investigadores con relación a la composición química de los productos alimenticios; las posibles fuentes de tales variaciones son: el método de análisis escogido, la raza del animal, la dieta de este entre otros.

5.2. Resultados para el diseño experimental

5.2.1. Resultados para el diseño preliminar

En esta fase se realizó una evaluación del incremento de la absorbancia, debido principalmente a la destrucción de los corpúsculos rojos, con la consiguiente liberación de la hemoglobina, proteína que para este experimento se considera contaminante; debido a que lo que se busca es la purificación de la albúmina sérica bovina.

La absorbancia fue medida en el plasma a una longitud de onda de 540 nm y fue directamente proporcional al incremento de la concentración de hemoglobina en el plasma.

En la etapa preliminar se buscaron las variables más importantes en el diseño experimental, el cual se realizó para determinar la velocidad, el tiempo y el anticoagulante adecuado para obtener un plasma de mayor rendimiento y calidad, durante el proceso de separación del plasma por centrifugación.

Teniendo como variables independientes: La velocidad de centrifugación (rpm), el tiempo (min), y Anticoagulantes (CITRATO – OXALATO y EDTA) (%).

Las variables dependientes son las siguientes: El rendimiento en porcentaje de plasma (%) y el grado de hemólisis estimado a partir de la absorbancia.

Los factores constantes son: La temperatura de centrifugación y el volumen de sangre a centrifugar.

En esta etapa se empleó un diseño factorial 3^2 con la adición de tres puntos centrales, haciendo un total de 11 tratamientos; a la que se le aplicó la metodología de superficie de respuesta para optimizar los datos. En este diseño factorial se evaluaron independientemente los anticoagulantes Citrato – Oxalato y EDTA, obteniendo respuestas de Rendimiento (%) y Hemólisis como absorbancia, para cada uno de los anticoagulantes.

En los cuadros nº 9 y 10 se presentan las matrices de planeamiento con los resultados obtenidos de las variables respuestas, para los anticoagulantes citrato-oxalato y EDTA respectivamente. También se presenta una columna denominada LOG_R la cual representa el logaritmo de la relación rendimiento / absorbancia.

CUADRO N° 9: MATRIZ DE PLANEAMIENTO PARA ANTICOAGULANTE CITRATO – OXALATO (0,4 %)

Tratamientos	Velocidad	Tiempo	Rendimiento	Absorbancia	LOG_R
1	-1,000	-1,000	36,000	0,684	1,721
2	1,000	-1,000	46,000	0,453	2,006
3	-1,000	1,000	42,000	0,495	1,927
4	1,000	1,000	49,000	0,417	2,070
5	-1,000	0,000	39,000	0,594	1,817
6	1,000	0,000	47,500	0,435	2,038
7	0,000	-1,000	44,000	0,512	1,934
8	0,000	1,000	45,000	0,432	2,018
9	0,000	0,000	44,500	0,472	1,974
10	0,000	0,000	45,000	0,476	1,980
11	0,000	0,000	44,500	0,477	1,969

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

CUADRO N° 10 : MATRIZ DE PLANEAMIENTO PARA ANTICOAGULANTE EDTA (0,4 %)

Tratamientos	Velocidad	Tiempo	Rendimiento	Absorbancia	LOG_R
1	-1,000	-1,000	34,000	0,733	1,667
2	1,000	-1,000	43,500	0,482	1,955
3	-1,000	1,000	42,000	0,528	1,900
4	1,000	1,000	44,000	0,475	1,966
5	-1,000	0,000	37,000	0,623	1,773
6	1,000	0,000	43,800	0,478	1,962
7	0,000	-1,000	42,200	0,535	1,897
8	0,000	1,000	43,000	0,474	1,957
9	0,000	0,000	42,600	0,492	1,937
10	0,000	0,000	43,000	0,570	1,878
11	0,000	0,000	43,200	0,530	1,911

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.2.1.1.Resultado del rendimiento usando el anticoagulante citrato-oxalato (0,4%)

En el cuadro nº 11 se observa el análisis de varianza de los resultados experimentales de las variables respuesta, rendimiento (Y1) y absorbancia (Y2), para las variables independientes, velocidad de centrifugación (X₁) y tiempo (X₂); dio diferencias significativas para un polinomio de segundo grado con interacción, para un valor de p (nivel de significancia) < 0,05 establecido para el presente estudio; por lo tanto la variación de los niveles tiempo y velocidad de centrifugación, tendrán un efecto notorio en el comportamiento de estas dos variables respuesta (Y1 y Y2).

La prueba de falta de ajuste fue no significativa en la evaluación del rendimiento; el cual obtuvo un valor $F_c = 16,40 < F_t = 19,20$. Es decir, que no hay razón suficiente para excluir ningún coeficiente del modelo matemático de la respuesta rendimiento, a pesar de que el coeficiente cuadrático del tiempo presenta un error de 0,7058; nivel de error que es mucho mayor al nivel de significancia permitido de 0,05. En conclusión, el modelo matemático no requiere de ajuste y es válido para efectos de predicción dentro de los rangos de los niveles establecidos para las variables tiempo y velocidad de centrifugación.

La variable más importante que afecta directamente al rendimiento es la velocidad de centrifugación, y no así el tiempo de centrifugado. Por esta razón al encontrar un error muy elevado para el coeficiente tiempo

cuadrático, se determina que la presencia o ausencia de este, no altera el valor final del rendimiento.

CUADRO N° 11: MODELO DE REGRESIÓN, ANÁLISIS DE VARIANCA PARA LOS MODELOS COMPLETOS CORRESPONDIENTES A LOS RESULTADOS DEL RENDIMIENTO Y ABSORBANCIA, USANDO CITRATO-OXALATO 0,4%.

$Y = 44,6316 + 4,25X_1 - 1,3289 X_1^2 + 1,66667 X_2 - 0,0789X_2^2 - 0,75 X_1X_2$					
$(\pm 0,1481) \quad (\pm 0,1178) \quad (+0,1814) \quad (+0,1178) \quad (+0,1814) \quad (\pm 0,1443)$					
ANÁLISIS DE VARIANCA PARA EL RENDIMIENTO					
Promedio de respuesta:	40,0454		Coficiente de Determinación (R ²):	0,9688	
Desviación :	1,01745		Coficiente de Variación (%):	2,5407	
VARIACIÓN	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regresión	132,278	5	2,645,558	30,996	5,050
Residuo	4,268	5	0,85351		
Falta de Ajuste	4,101	3	136,696	16,404	19,200
Error Puro	0,167	2	0,08333		
Total	136,545	10			
% Variancia Explicada	=	96,880			
% Máxima Variancia Explicada	=	99,880			
ANÁLISIS DE VARIANCA PARA LA ABSORBANCIA					
$Y = 0,4748 - 0,078 X_1 + 0,03989 X_1^2 - 0,05083 X_2 - 0,0026 X_2^2 + 0,03825 X_1 X_2$					
$(\pm 0,0014) \quad (\pm 0,0011) \quad (\pm 0,0017) \quad (\pm 0,0011) \quad (\pm 0,00166) \quad (\pm 0,0013)$					
Promedio de respuesta:	0,4952		Coficiente de Determinación (R ²):	0,9940	
Desviación :	0,0086		Coficiente de Variación (%):	1,737	
VARIACIÓN	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regresión	0,062068	5	0,012414	166,319	5,050
Residuo	0,000373	5	0,000075		
Falta de Ajuste	0,000359	3	0,000120	17,104	19,200
Error Puro	0,000014	2	0,000007		
Total	0,062442	10			
% Variancia Explicada	=	99,402			
% Máxima Variancia Explicada	=	99,978			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Modelo de regresión completo, con variables y valores codificados (errores experimentales abajo entre paréntesis); negrito = significativo al 5% de probabilidad; X1 = velocidad de centrifugación (rpm); X2 = tiempo de centrifugación (min); R2 = coeficiente de determinación; C. V. = coeficiente de variación; GL = grados de libertad; SQ = suma de los cuadrados; QM = cuadrado medio; Fc = F calculado; Ft = F tabular.

Es conveniente señalar que para los datos obtenidos no se estudiaron otros factores que pudieran afectar los valores del rendimiento, como son: temperatura de centrifugación, volumen de centrifugación, sistema de centrifugación, dosis de anticoagulante y otros que podrían tener efecto significativo en la respuesta rendimiento. Si estas variables fueran consideradas, estas reportarían una la máxima variable explicable de 99,88 %, como se muestra en el cuadro n° 11. Por lo tanto el valor de varianza explicada de 96,88 %, demuestra que la elección de las variables velocidad y tiempo de centrifugación fueron las más adecuadas para el presente estudio.

En la figura n° 8, correspondiente a la evaluación del tiempo de centrifugación y velocidad de centrifugación con la adición de citrato-oxalato 0,4 % como anticoagulante, se observa un mayor rendimiento, para un área comprendida entre los puntos de un tiempo de 14 minutos con 5000 rpm y 20 minutos con 4400 rpm, ambos parámetros corresponden al rendimiento máximo de 47,315 %.

Según la figura de superficie de respuesta se observa una tendencia a maximizar el rendimiento a medida que aumenta la velocidad de centrifugación, encontrándose los máximos valores a partir de 14 minutos de centrifugación, a demás un cambio de velocidad afecta significativamente el rendimiento en comparación con tratamientos que incluyan un cambio en el tiempo de centrifugación.

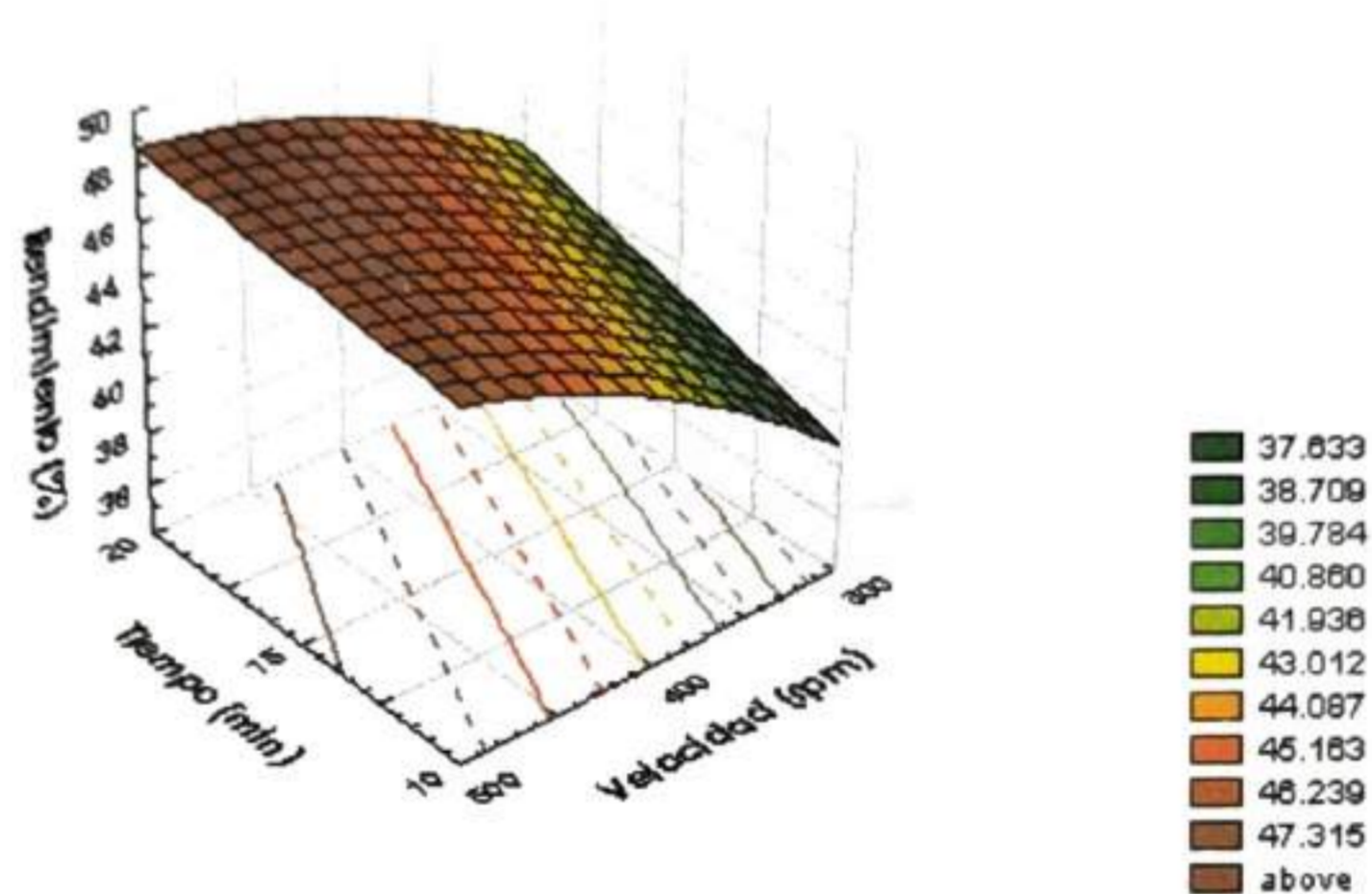


FIGURA N° 8 : DIAGRAMA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA MOSTRANDO EL EFECTO DEL TIEMPO Y VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL PLASMA BOVINO USANDO CITRATO-OXALATO 0,4 %.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.2.1.2. Resultados de la absorbancia usando el anticoagulante citrato-oxalato (0,4 %)

Para la evaluación de la variable absorbancia se utilizó la metodología de superficie de respuesta, cuyos datos se ubican en el cuadro n° 9, que proporcionó como resultado el modelo matemático, en el cual no resultó significativo el efecto cuadrático de la variable tiempo (X_2^2), obteniendo un error de 0,257567; dando como resultado un modelo con un coeficiente de determinación de

99,40 %, que hace del modelo hallado una función matemática válida para predecir dentro de los rangos de las variables en estudio, con un nivel de confianza del 95%. Los parámetros del modelo son, un promedio de 0,4952 con una desviación estándar de 0,0086 y un coeficiente de variación de 1,7442 %.

Los análisis de varianza muestran una falta de ajuste no significativo debido a que presenta ($F_c = 17,1 < F_t = 19,20$), que indica que no es necesario excluir ninguno de los coeficientes hallados; según lo establecido por Montgomery (1991), indica que una falta de ajuste no significativo se debe a que el modelo no requiere de ajustes en sus coeficientes, y este es válido para efectos de predicción dentro de los niveles de las variables independientes al nivel de significancia establecido, que para la presente investigación de 0,05.

En la figura nº 9 de superficie de respuesta usando citrato – oxalato como anticoagulante; se observa el área donde se registra la menor absorbancia que está comprendida entre los puntos de tiempo de 20 minutos de centrifugado con 3700 rpm de velocidad de centrifugación y 15 minutos de centrifugado con 5000 rpm de velocidad de centrifugación. Según la figura nº 9 el efecto de las variables se hace notar de manera inversa ya que a mayor velocidad y tiempo de centrifugación, menor es el valor de la absorbancia que

es de 0,436; lo que indica una menor hemólisis registrada en el proceso, y por consiguiente este es directamente proporcional a la cantidad de hemoglobina presente en el plasma, que es desventajoso para efectos de la purificación de la albúmina sérica bovina.

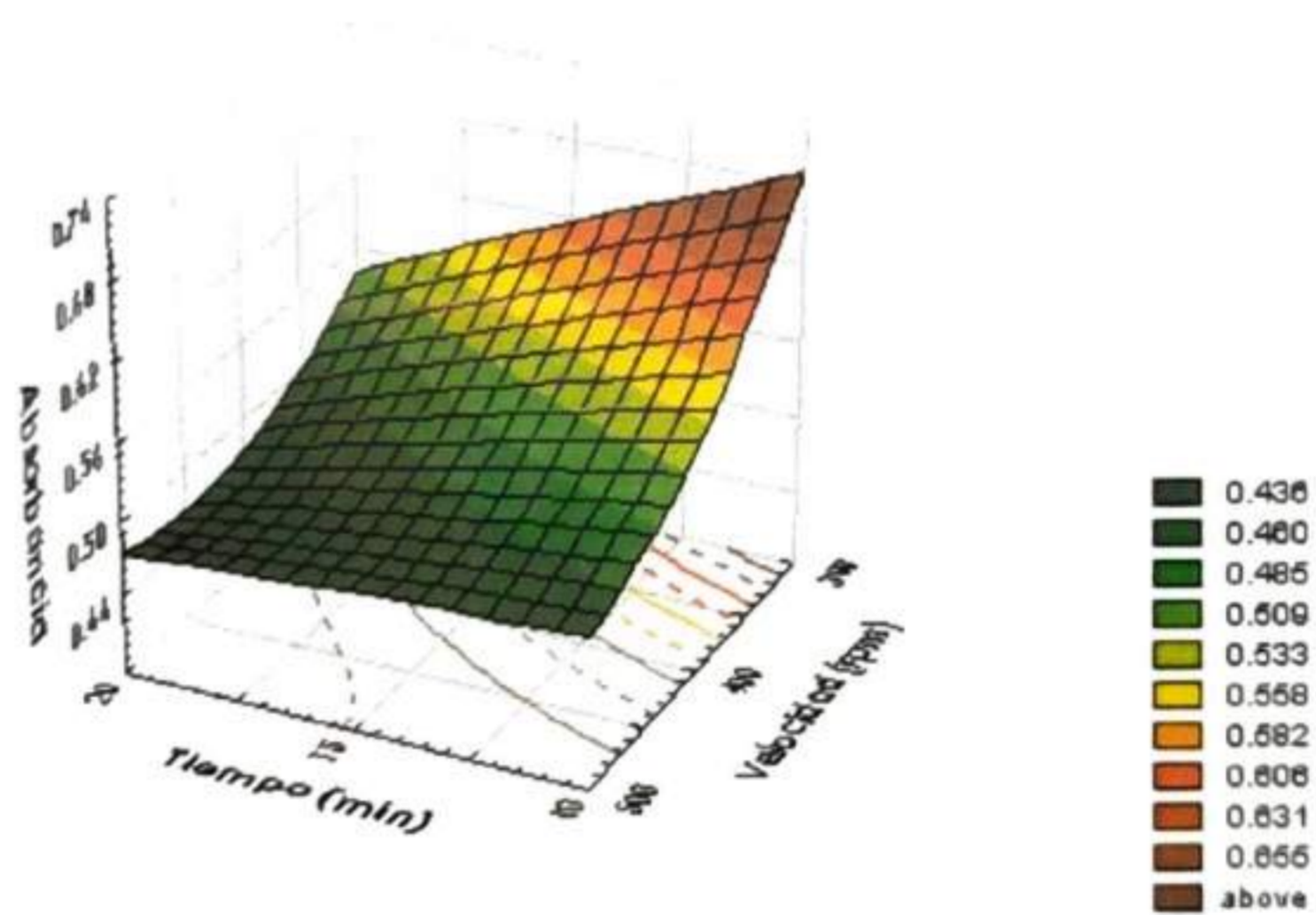


FIGURA N° 9: DIAGRAMA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA MOSTRANDO EL EFECTO DEL TIEMPO Y VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE EL NIVEL DE ABSORBANCIA DEL PLASMA BOVINO USANDO CITRATO - OXALATO 0,4 %.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.2.1.3. Resultados del rendimiento usando el anticoagulante EDTA (0,4%)

En el cuadro n° 12 se observa el modelo matemático completo, para la variable rendimiento, en la cual se observa que el efecto cuadrático del Tiempo no es significativo (X_2^2), ya que presenta un error de 0,678683, que es mayor al nivel de significancia establecido para el presente estudio, que es de 0,05. El modelo presenta un coeficiente de determinación significativo de 95,12 %, por lo tanto se puede decir que el modelo sirve para la predicción dentro de los rangos establecidos para las variables en estudio; el promedio de datos obtenidos del rendimiento es 41,66 % con una desviación estándar de 0,9934 y un coeficiente de variación de 2,3843 %, se destaca que la falta de ajuste no es significativa en el modelo completo debido a que presenta ($F_c = 16,95 < F_t = 19,20$) por el cual se considera que los coeficientes del modelo hallado son válidos para los efectos predictivos.

CUADRO N° 12 : MODELO DE REGRESIÓN, ANÁLISIS DE VARIANCA PARA LOS MODELOS COMPLETOS CORRESPONDIENTES A LOS RESULTADOS DEL RENDIMIENTO Y ABSORBANCIA, USANDO EDTA 0,4%.

$Y_3 = 42,7632 + 3,0500 X_1 - 2,1079 X_1^2 + 1,5500 X_2 + 0,0921 X_2^2 - 1,8750 X_1 X_2$ <p style="text-align: center;"> <small>(+0,1567) (+0,1247) (+0,919) (+0,1247) (+0,1919) (+0,1528)</small> </p>					
ANÁLISIS DE VARIANCA PARA EL RENDIMIENTO					
Promedio de respuestas : 41,6636			Coeficiente de determinación (R ²) : 0,9512		
Desviación standar : 0,9934			Coeficiente de variación (C. V. = %) : 2,3843		
VARIACIÓN	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regresión	96,1511	5	19,23022	19,49	5,05
Residuo	4,9344	5	0,98688		
Falta Ajuste	4,7477	3	1,582567	16,95	19,20
Error Puro	0,1867	2	0,09335		
Total	101,0855	10			
% de Variancia Explicada = 95,12					
% Máxima de Variancia Explicable = 99,82					
$Y_4 = 0,5243 - 0,0748 X_1 + 0,0357 X_1^2 - 0,0455 X_2 - 0,0102 X_2^2 + 0,0495 X_1 X_2$ <p style="text-align: center;"> <small>(+0,0200) (+0,0159) (+0,0245) (+0,0159) (+0,0245) (+0,0195)</small> </p>					
ANÁLISIS DE VARIANCA PARA LA ABSORBANCIA					
Promedio de respuestas: 0,5168			Coeficiente de determinación (R ²) : 0,9320		
Desviación standar : 0,0293			Coeficiente de Variación (C. V.= %): 5,6804		
VARIACIÓN	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regresión	0,059055	5	0,011811	13,71	5,05
Residuo	0,004309	5	0,0008618		
Falta Ajuste	0,001266	3	0,000422	0,28	19,2
Error Puro	0,003043	2	0,0015215		
Total	0,063364	10			
% de Variancia Explicada = 93,20					
% Máxima de Variancia Explicable = 95,20					

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

OBSERVACIONES GENERALES:

Modelo de regresión completo, con variables y valores codificados (errores experimentales abajo entre paréntesis); **negrito** = significativo al 5% de probabilidad; X1 = velocidad de centrifugación (rpm); X2 = tiempo de centrifugación (min); R2 = coeficiente de determinación; C. V. = coeficiente de variación; GL = grados de libertad; SQ = suma de los cuadrados; QM = cuadrado medio; Fc = F calculado; Ft = F tabular

En la Figura n° 10, correspondiente a la evaluación del tiempo de centrifugación y velocidad de centrifugación con la adición de EDTA como anticoagulante, se observa un mayor rendimiento, entre los puntos que corresponden a una curva entre un tiempo de 10 minutos con 4700 rpm y 20 minutos de centrifugación con 3600 rpm, ambos parámetros corresponden a un rendimiento máximo de 43,633 %.

Según la figura de superficie de respuesta se observa que la velocidad de centrifugación es el efecto mas importante debido a que dentro de su rango establecido se encuentran los valores de rendimientos más altos.

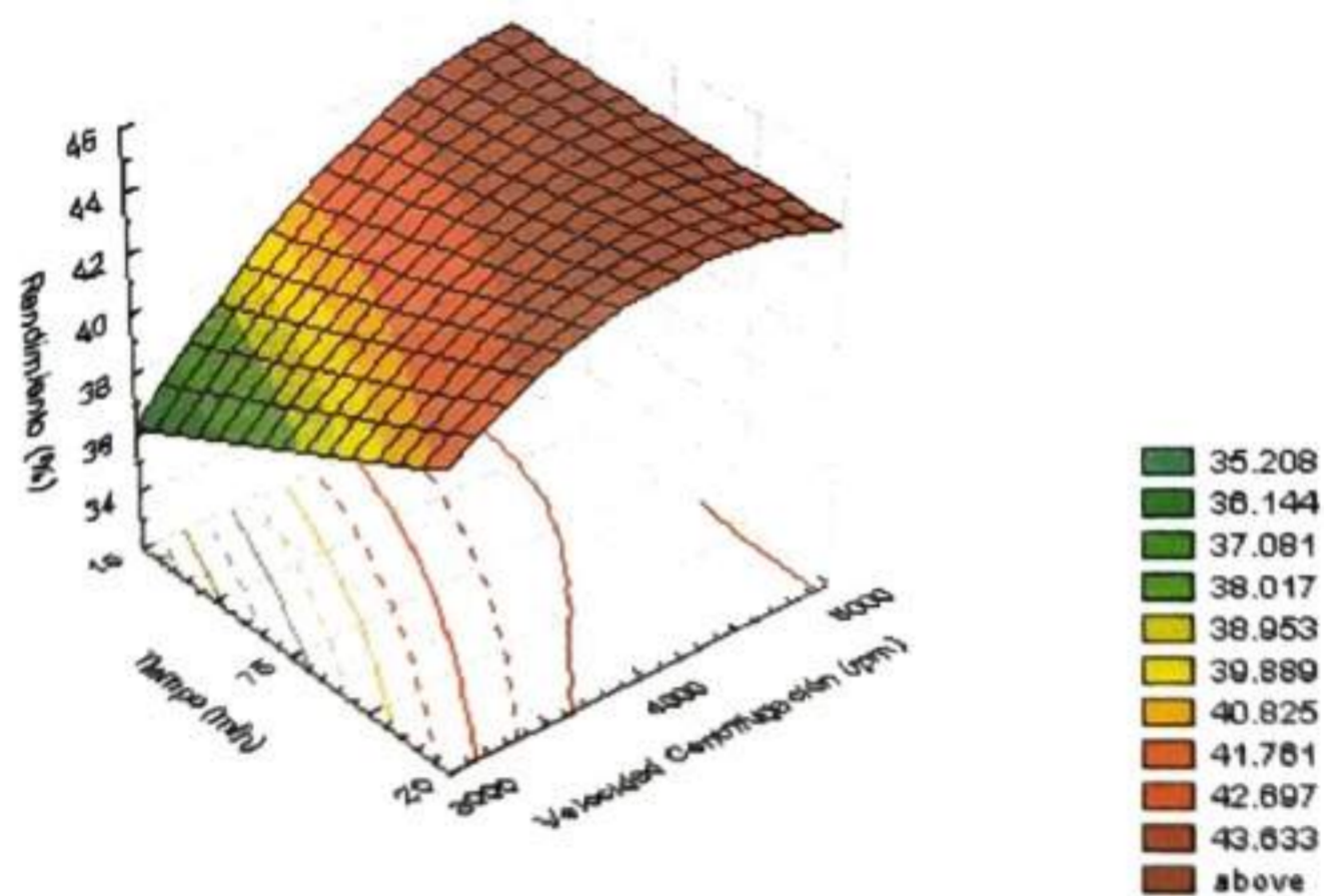


FIGURA N° 10: DIAGRAMA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA MOSTRANDO EL EFECTO DEL TIEMPO Y VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DEL PLASMA BOVINO, USANDO EDTA 0,4 %.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.2.1.4. Resultado de absorbancia usando el anticoagulante EDTA (0,4%)

Para la evaluación de la variable absorbancia se utilizó la metodología de superficie de respuesta, cuyos resultados experimentales se ubican en el cuadro n° 12, que dio como resultado el modelo matemático, en el cual el único efecto significativo resultó ser el efecto lineal de velocidad de centrifugación (X_1), con un valor de error de 0,042418; y un coeficiente de determinación de 93,20 % que hace del modelo hallado una función matemática válida para predecir dentro de los rangos de las variables en estudio, con un nivel de confianza del 95%. Los parámetros del modelo hallado son, un promedio de 0,5168 con una desviación estándar de 0,0293 y un coeficiente de variación de 5,6804 %.

El análisis de varianza muestra una falta de ajuste no significativo debido a los datos obtenidos ($F_c = 0,28 < F_t = 19,20$), que indica que no es necesario excluir ninguno de los coeficientes hallados; según lo establecido por Montgomery (1991).

En la Figura n° 11 de superficie de respuesta usando EDTA como anticoagulante, se observa que la menor absorbancia se registra en la curva comprendida entre los puntos de un tiempo de 20 minutos con 3000 rpm de velocidad de centrifugación y 10 minutos con 4800 rpm de centrifugación.

La figura n° 11, muestra según los resultados obtenidos, que la velocidad de centrifugación registra valores muy diferentes; lo que demuestra el efecto significativo de esta variable con respecto a la absorbancia; por el contrario el efecto del tiempo es prácticamente nulo ya que a diferentes tiempos de centrifugación establecidos según diseño, el valor de la absorbancia es prácticamente la misma y corresponde a 0,487.

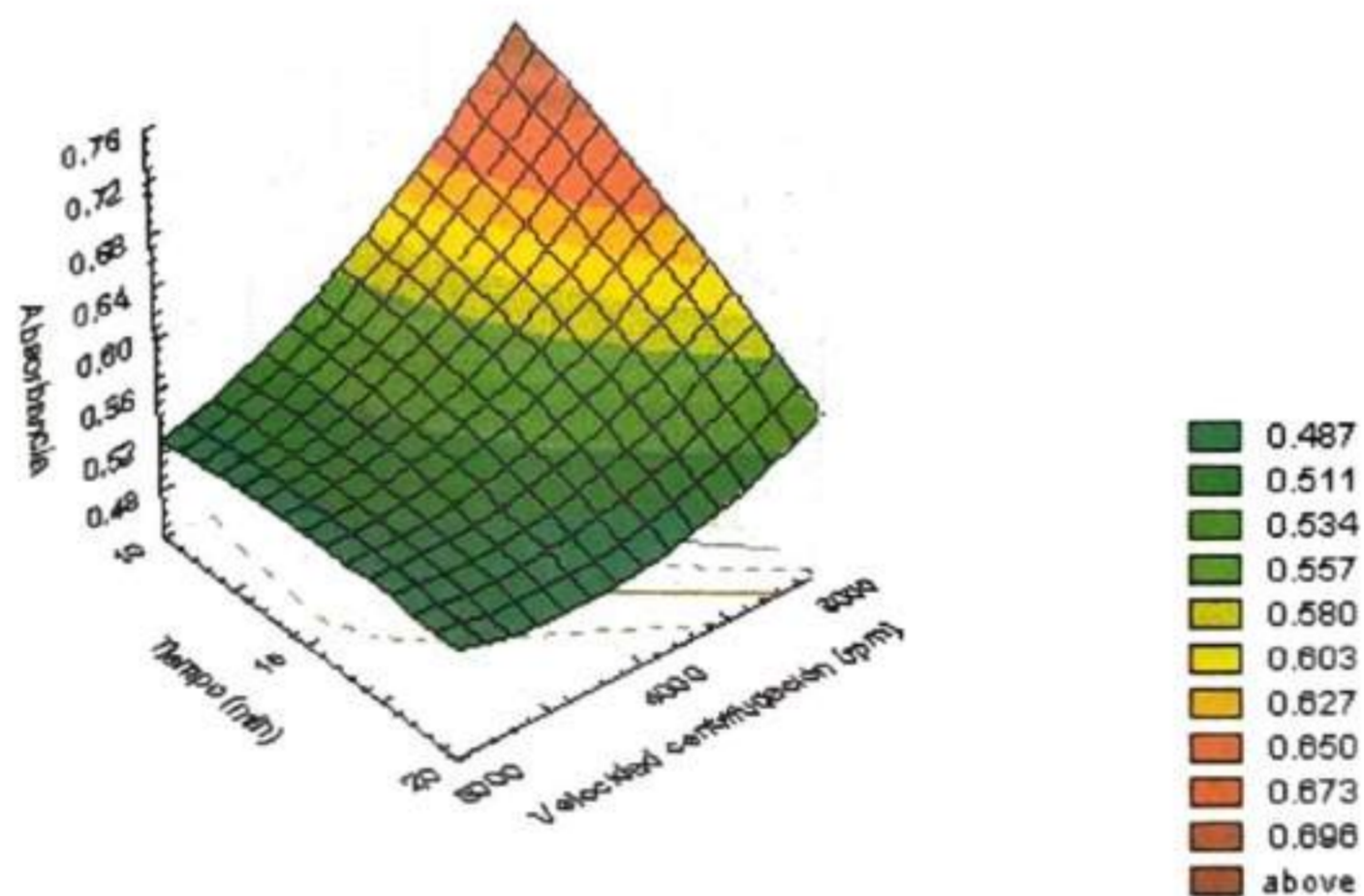


FIGURA N° 11: DIAGRAMA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA MOSTRANDO EL EFECTO DEL TIEMPO Y VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN SOBRE EL NIVEL DE ABSORBANCIA DEL PLASMA BOVINO, USANDO EDTA 0,4 %
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.2.1.5. Resultado del proceso de optimización en función a las variables estudiadas (LOG_R).

Después de realizado el análisis de rendimiento y absorbancia para cada uno de los anticoagulantes independientemente, se observa que los mejores resultados se encontraron utilizando como anticoagulante la mezcla de (citrato de sodio – oxalato de amonio) 0,4 %; en donde se obtiene el mayor rendimiento y la menor absorbancia, encontrando de esta manera una forma de expresar este resultado en conjunto, es decir creando una relación entre el rendimiento / absorbancia, y aplicando el logaritmo a este número (LOG_R), obteniendo los mejores resultados cuanto mayor sea este valor.

CUADRO N° 13 : MODELO DE REGRESIÓN, ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA EL MODELO COMPLETO CORRESPONDIENTE A EL RESULTADO DE RENDIMIENTO/ ABSORBANCIA (LOG_R), UTILIZANDO CITRATO-OXALATO.

$Y_1 = 1,974 + 0,1081 X_1 - 0,0459 X_1^2 + 0,0589 X_2 - 0,00259 X_2^2 - 0,3545 X_1 X_2$					
$(\pm 0,0028) \quad (\pm 0,0022) \quad (\pm 0,00345) \quad (\pm 0,0022) \quad (+ 0,0034) \quad (\pm 0,0027)$					
ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA EL LOG R					
Promedio de respuestas : 1,9504			Coeficiente de determinación (R ²) : 0,9908		
Desviación standar : 0,013736			Coeficiente de variación (C. V. = %) : 0,7043		
VARIACIÓN	SQ	GL	QM	Fc	Ft
Regresión	0,1016	5	0,0203	107,73	5,05
Residuo	0,00094	5	0,0002		
Falta Ajuste	0,00088	3	0,0003	9,73	19,16
Error Puro	0,00006	2	0,0000		
Total	0,10258	10			
% de Variancia Explicada = 99,08					
% Máxima de Variancia Explicable = 99,94					

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro n° 13 se aprecia los resultados obtenidos para LOG_R, obteniendo un coeficiente de determinación de 99,08 %, un promedio de respuestas 1,9504; desviación estándar de 0,013736 y un coeficiente de variación de 0,7043. El efecto de tiempo cuadrático no resulto significativo (X_2^2), ya que obtuvo un valor de error de 0,5311 y que es mayor que el nivel de significancia establecido para este ensayo que es de 0,05. El análisis de varianza muestra a demás que no es necesario realizar un ajuste debido a que ($F_c = 9,73 < F_t = 19,16$), por lo tanto el modelo es valido para predecir dentro de los rangos establecidos.

En la figura n° 12 se observa el efecto de las variables independientes en la relación LOG_R, y se verifica que el factor mas importante que afecta esta relación es la velocidad de centrifugación ya que a diferentes velocidades el comportamiento de LOG_R es significativamente diferente, por el contrario el efecto de tiempo de centrifugación no se manifiesta con valores tan diferentes.

La importancia de maximizar la relación de LOG_R radica en que se puede obtener de manera conjunta la región de máxima respuesta que representa el máximo rendimiento con la mínima absorbancia. Según la figura n° 12, se visualiza un área de máxima respuesta comprendida entre los puntos de 15 minutos con 5000 rpm y 20 minutos con 4000 rpm.

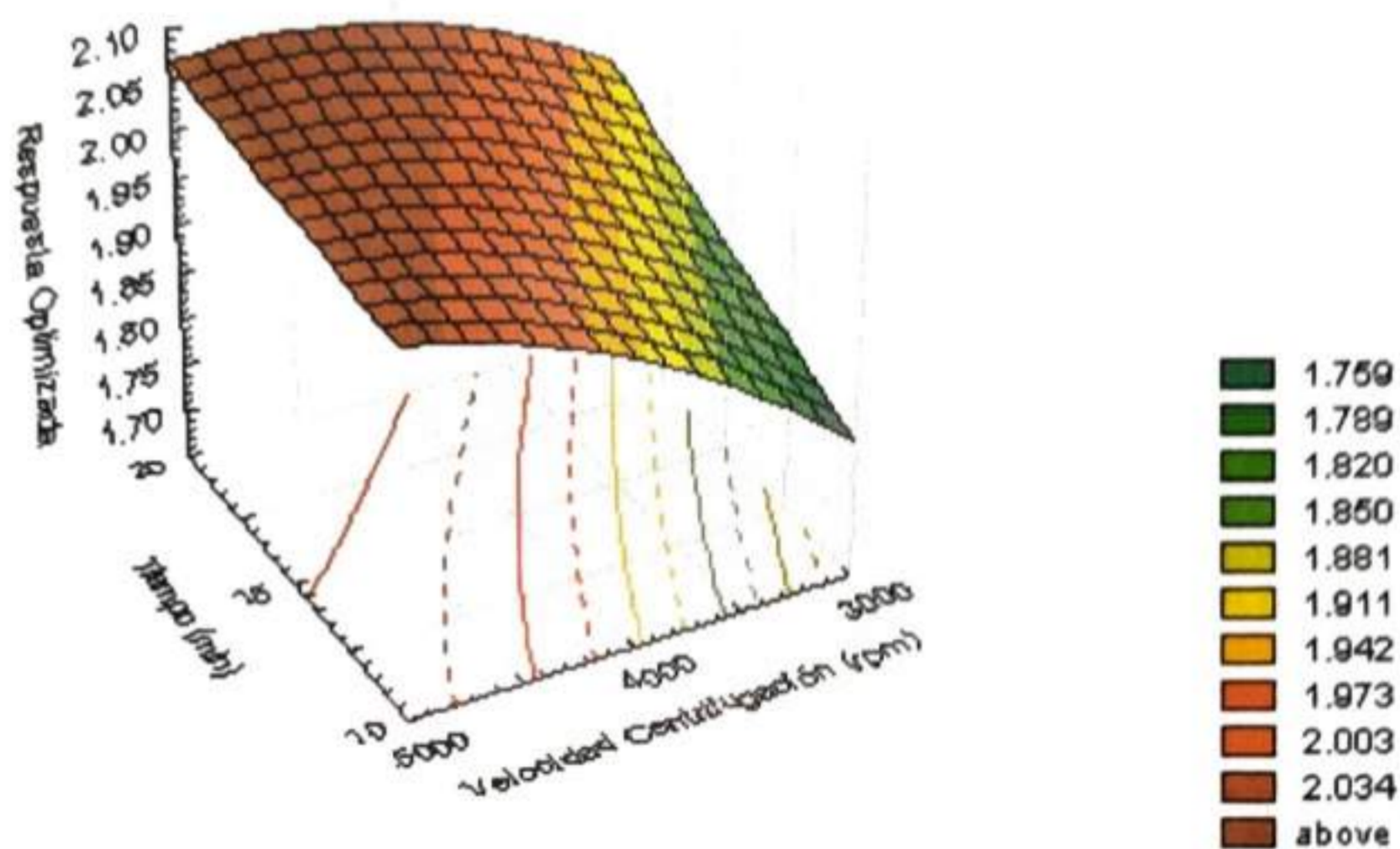


FIGURA N° 12 : DIAGRAMA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA MOSTRANDO EL MÁXIMO RENDIMIENTO Y LA MÍNIMA ABSORBANCIA DURANTE LA EXTRACCIÓN DEL PLASMA BOVINO, USANDO CITRATO – OXALATO 0,4%.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

De los resultados obtenidos se deduce que para la de obtención de plasma bovino se seguirá con la técnica de la adición de la mezcla de citrato de sodio – oxalato de amonio como anticoagulante y se utilizará un tiempo de centrifugación de 20 minutos y una velocidad de centrifugación de 4500 rpm.

5.3. Resultados para la primera evaluación

5.3.1. Evaluación del diseño experimental unifactorial

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico Stat Graphics v. 5.0

5.3.1.1. Resultado de rendimiento

En el cuadro n° 14, se detalla los rendimientos y sus promedios, para cada método de obtención de albúmina sérica bovina.

En el cuadro n° 15 de rendimiento se analizan las técnicas de obtención de albúmina sérica bovina, mediante un análisis de varianza; que muestra que existe diferencia significativa al nivel del 95 % de confianza entre las medias de los tratamientos de los métodos de obtención de albúmina sérica bovina, siendo el método de precipitación por sales la de mayor rendimiento, que presenta un valor de 31,115 %, seguido del método por termocoagulación selectiva con un 23,965 % y finalmente del método de precipitación por ácido con 18,0125 %.

CUADRO N° 14 : RESULTADOS DE LOS RENDIMIENTOS DE ALBÚMINA POR MÉTODO DE OBTENCIÓN (g/L) PLASMA.

REPETICIONES	PP. POR ÁCIDO	TERMOCOAGULACIÓN	PP. POR SALES
1	17,36	21,30	28,53
2	19,72	26,15	28,78
3	16,35	24,80	32,35
4	18,62	23,61	34,80
PROMEDIOS	18,0125	23,965	31,115

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

CUADRO N° 15 : ANÁLISIS DE VARIANZA PARA RENDIMIENTO A DIFERENTES MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F Calculado	F Tabla
Técnicas	344,307	2	172,1535	33,3826	4,26
Error	46,4129	9	5,156988		
Total	390,7199	11			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

En la figura n° 13, se observa la distribución de las medias de las diferentes métodos, sus medias de posición y dispersión; observando que el método de precipitación por ácido presenta un rendimiento menor a el rendimiento obtenido por el método de termocoagulación selectiva, y ésta a su vez tiene un rendimiento menor a la obtenida por precipitación por sales. A pesar de los resultados obtenidos, ésta evaluación no se puede considerar definitiva para elegir el mejor método de obtención de albúmina sérica bovina; ya que para esta elección se debe considerar el análisis de las pruebas de electroforesis y barrido espectrofotométrico (screening).

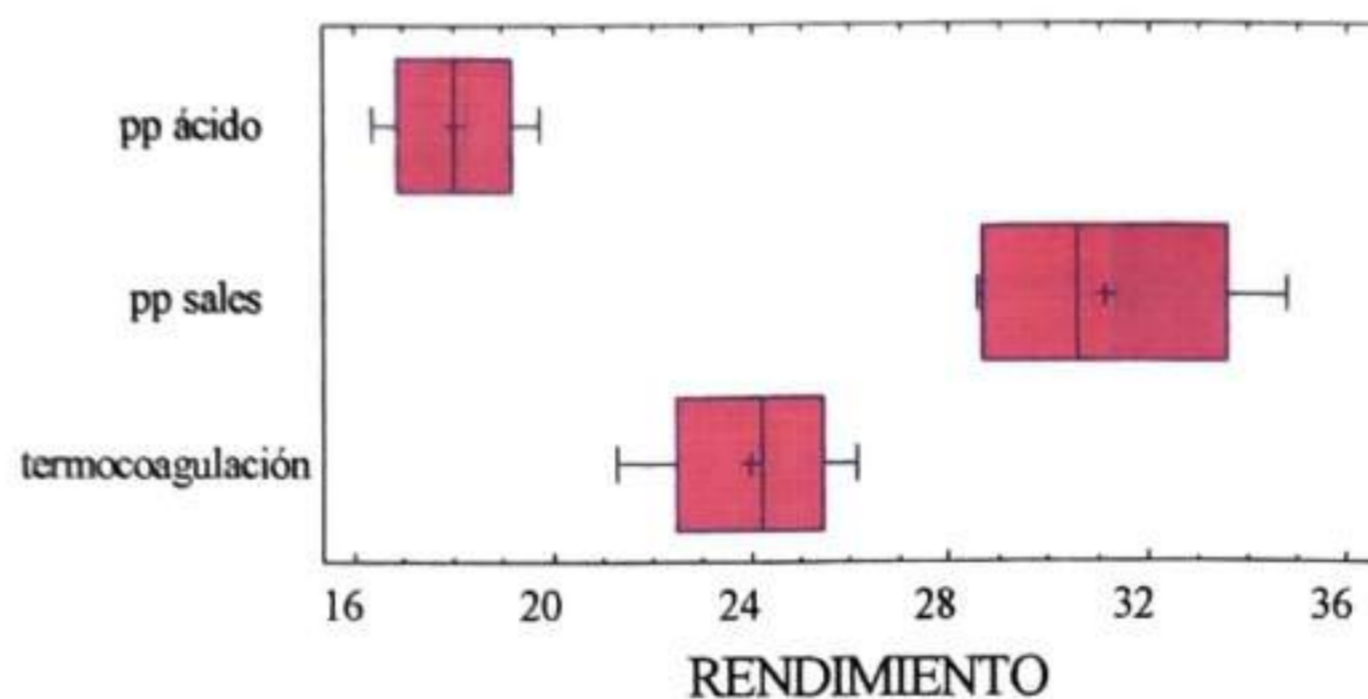


FIGURA N° 13: DISEÑO DE CAJA PARA LAS MEDIAS, MEDIANA Y DESVIACIÓN DE MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

5.3.1.2. Resultado de humedad

En el cuadro n° 16 se muestran los datos obtenidos del análisis de humedad realizado independientemente para cada método de obtención de albúmina sérica bovina.

En el cuadro n° 17 se analizaron resultados de humedad correspondiente a los tres métodos de obtención de albúmina sérica bovina; el análisis de varianza al 95 % de confianza muestra que no existe diferencia significativa entre las medias de los métodos. La prueba de significancia de tukey que complementa al análisis de varianza muestra que, las medias de los métodos de

termocoagulación selectiva y precipitación por sales son significativamente diferentes; y que las medias de los métodos de precipitación por ácido y termocoagulación selectiva no son significativamente diferentes.

En la figura n° 14 de cajas se observa la distribución de las medidas de distribución y dispersión para todos los datos de humedad registrados de los tres métodos de obtención de albúmina sérica bovina.

El método que menor humedad reporta es la de precipitación por sales siendo de 2,975 %, seguido del método de termocoagulación selectiva con 4,75 %, y finalmente se encuentra el método de precipitación por ácido con 5,375 %. Durante la cristalización y después de esta, se observó en el método de precipitación por sales que la mayoría de los cristales formados pertenecen a residuos de sales de sulfato de amonio, lo cual se comprobará mas adelante con la prueba de barrido espectrofotométrico (screening) y electroforesis. Finalmente se encuentra que los métodos de precipitación por sales y termocoagulación selectiva están dentro del rango permitido por los indicadores obtenidos del certificado de análisis de Sigma Aldrich.

CUADRO N° 16 : RESULTADOS DE LAS HUMEDADES DE LA ALBÚMINA, POR MÉTODO DE OBTENCIÓN % (P/P).

REPETICIONES	PP. POR ÁCIDO	TERMOCOAGULACIÓN	PP. POR SALES
1	5,40	4,50	2,70
2	5,00	4,10	3,30
3	6,20	4,80	2,90
4	4,90	5,60	3,00
PROMEDIOS	5,375	4,750	2,975

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

CUADRO N° 17 : ANÁLISIS DE VARIANZA PARA HUMEDAD A DIFERENTES MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F Calculado	F Tabla
Técnicas	12,4017	2	6,20085	22,82521	4,26
Error	2,45	9	0,271666		
Total	14,8467	11			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

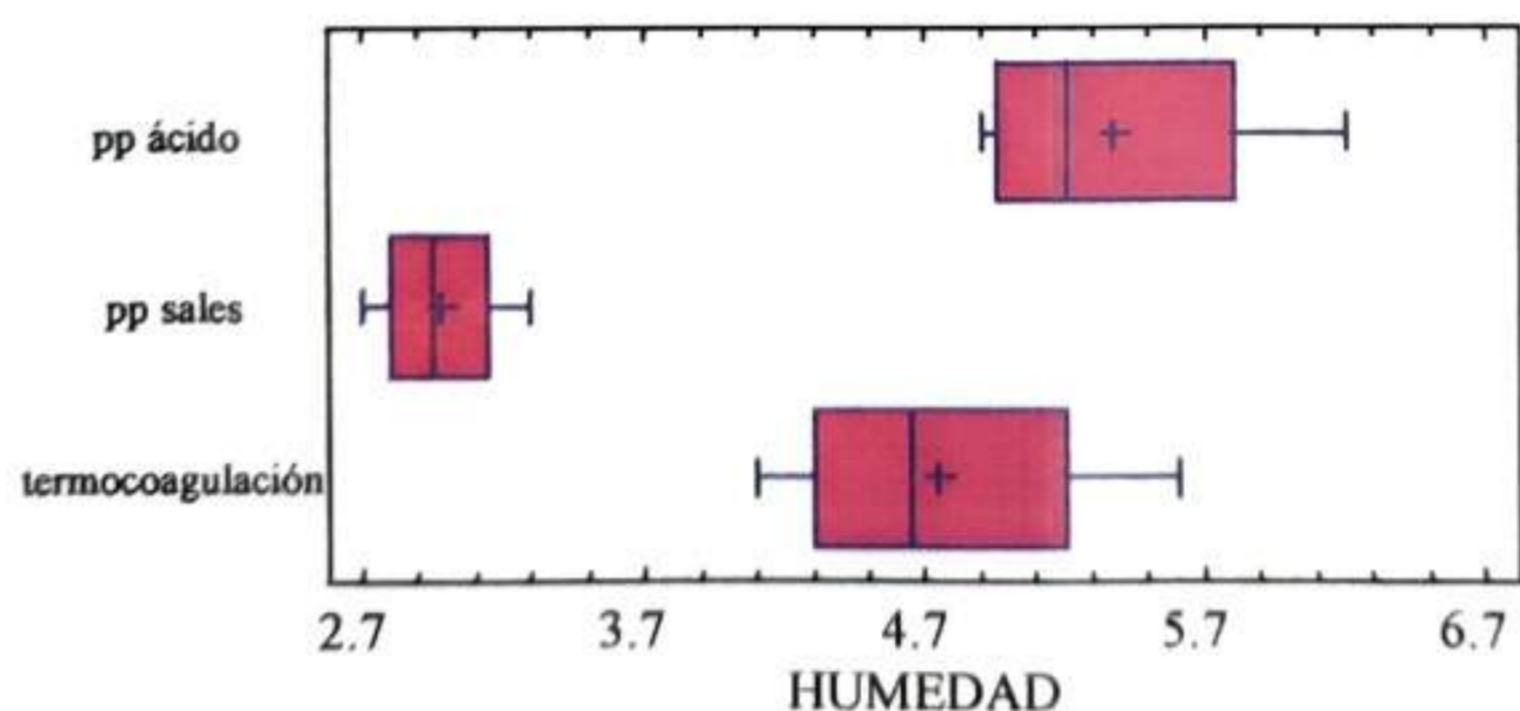


FIGURA N° 14 : DISEÑO DE CAJA PARA LAS MEDIAS, MEDIANA Y DESVIACIÓN DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

5.3.1.3. Resultados de los screening

En el cuadro n° 18, se detallan los resultados de las máximas absorbancias registrados en los screenings, realizados a cada uno de los métodos de obtención de albúmina sérica bovina.

CUADRO N° 18 : RESULTADOS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS POR SCREENING, POR MÉTODO DE OBTENCIÓN

REPETICIONES	PP. POR ÁCIDO	TERMOCOAGULACIÓN	PP. POR SALES
1	0,1863	0,6540	0,5323
2	0,3371	0,6459	0,3113
3	0,2727	0,6980	0,4580
4	0,5322	0,6912	0,3640
PROMEDIOS	0,3320	0,6723	0,4164

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

Al realizar este análisis se debe de tener en cuenta que para poder evaluar los tres métodos es necesario tener el patrón adecuado para poder realizar la comparación entre las absorbancias y además poder visualizar el comportamiento de el barrido espectrofotométrico y la forma de la curva perteneciente a la albúmina sérica bovina.

En la figura n° 15 se muestra el screening realizado a la albúmina patrón marca Sigma Aldrich , con una concentración de 1mg/ml, se puede observar que el pico máximo de absorbancia se ubica a los 279 nm, teniendo como resultado una absorbancia de 0,6672 el cual pertenece a un 98 % de pureza, como lo indica su certificado de análisis.

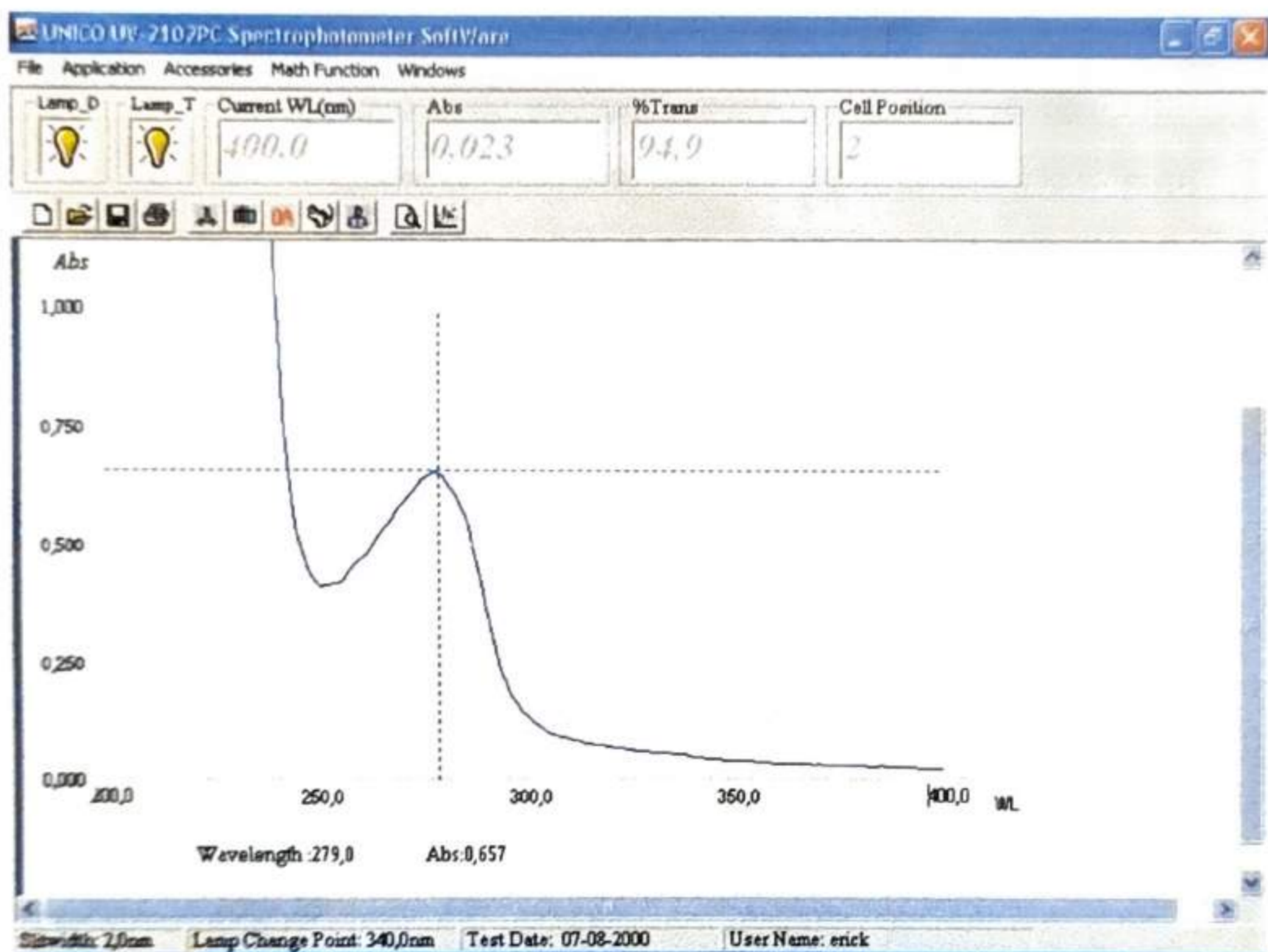


FIGURA N° 15: SCREENING DE ALBÚMINA PATRÓN MARCA SIGMA ALDRICH. (ABS 279 nm = 0,6672)
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Al realizar el screening para la albúmina sérica bovina obtenida por el método de termocoagulación selectiva que se observa en la figura n° 16; se determina que posee una cierta similitud con respecto a la albúmina patrón Sigma Aldrich. Su absorbancia obtuvo un valor de 0,6723 en el pico máximo de 279 nm.

Al realizar los cálculos para determinar su pureza, se obtuvo como resultado que esta albúmina obtenida por termocoagulación selectiva posee una pureza de 98,75 %; dato obtenido por la fórmula del anexo XI.

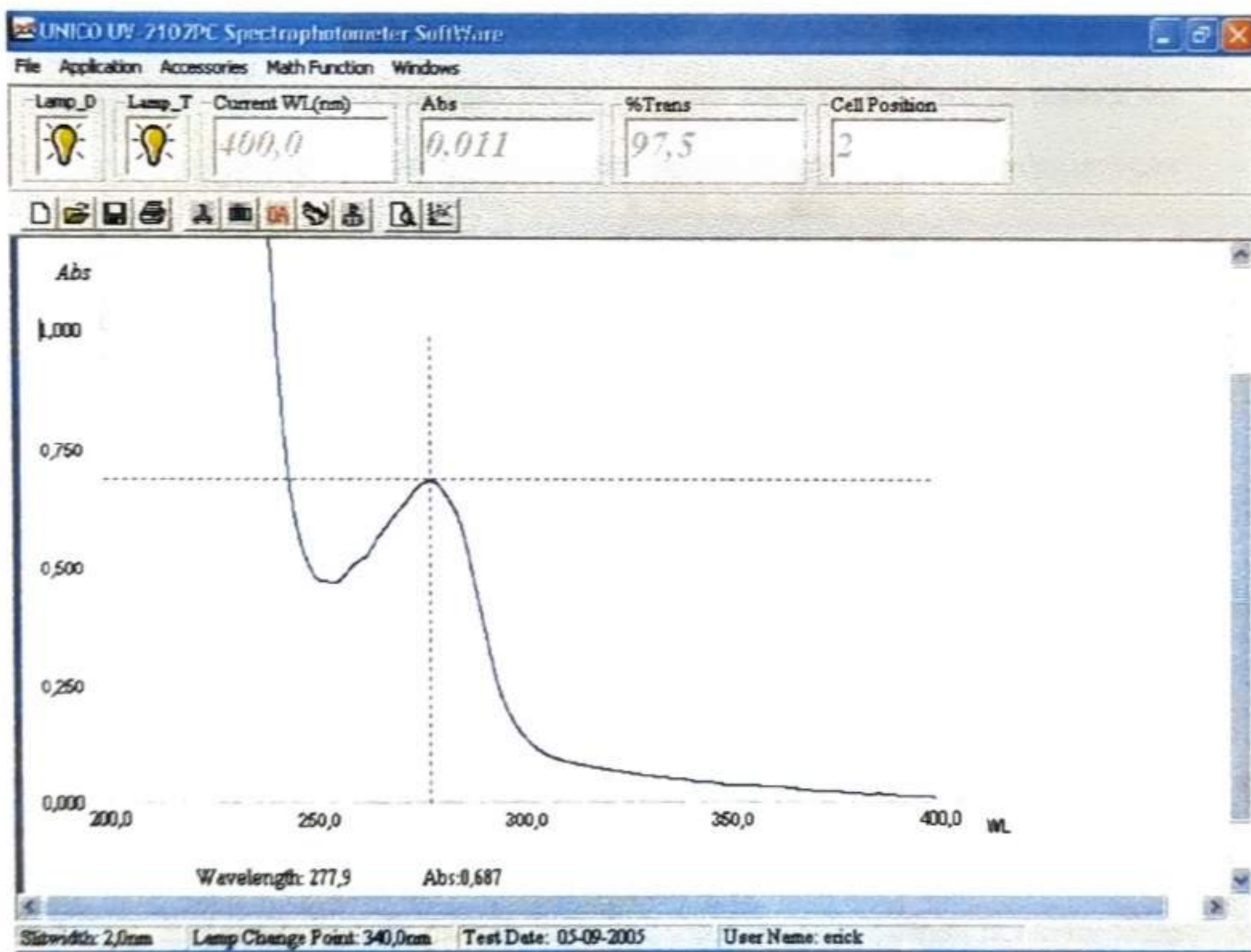


FIGURA N° 16 : SCREENING DE LA ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACIÓN SELECTIVA (ABS 279 nm = 0,6723)
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Para el caso de la albúmina sérica bovina obtenida el método de precipitación por sales, se observó que no guarda ninguna semejanza a la curva obtenida por la albúmina patrón, como se muestra en la figura nº 17. Teniendo como resultado una absorbancia de 0,4164 obtenido en el máximo pico a 279 nm, al realizar los cálculos de pureza con la fórmula del anexo XI, se encuentra un valor de 61,16 % de pureza.

Al observar el screening de la albúmina sérica bovina obtenida por el método de precipitación por ácidos, que se muestra en la figura nº 18; se observó que tampoco tiene una semejanza a la curva hallada con el patrón Sigma Aldrich; teniendo como absorbancia máxima de 0,3320 medida a 279 nm, a la cual le corresponde un grado de pureza de 48,78 %.

Luego de analizar los métodos de precipitación por sales y precipitación por ácido, mediante esta prueba de screening, se puede determinar que estos dos métodos no son de interés, por presentar una mínima cantidad y pureza de proteínas; por lo tanto no se tomaron en cuenta para realizar la cromatografía por filtración en gel de sephadex G-75.

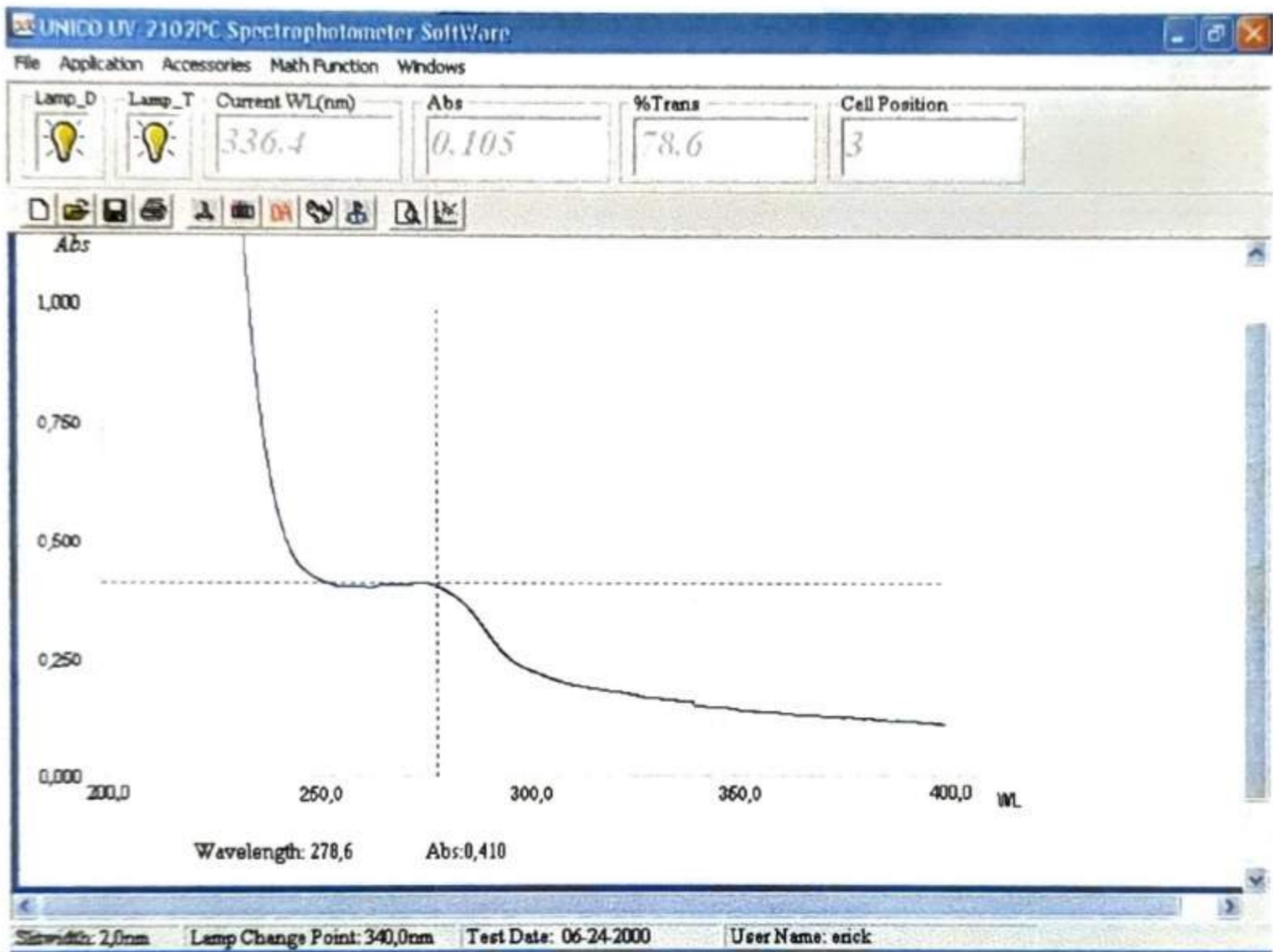


FIGURA N° 17 : SCREENING DE ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES. (ABS 279 nm = 0,4164)

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

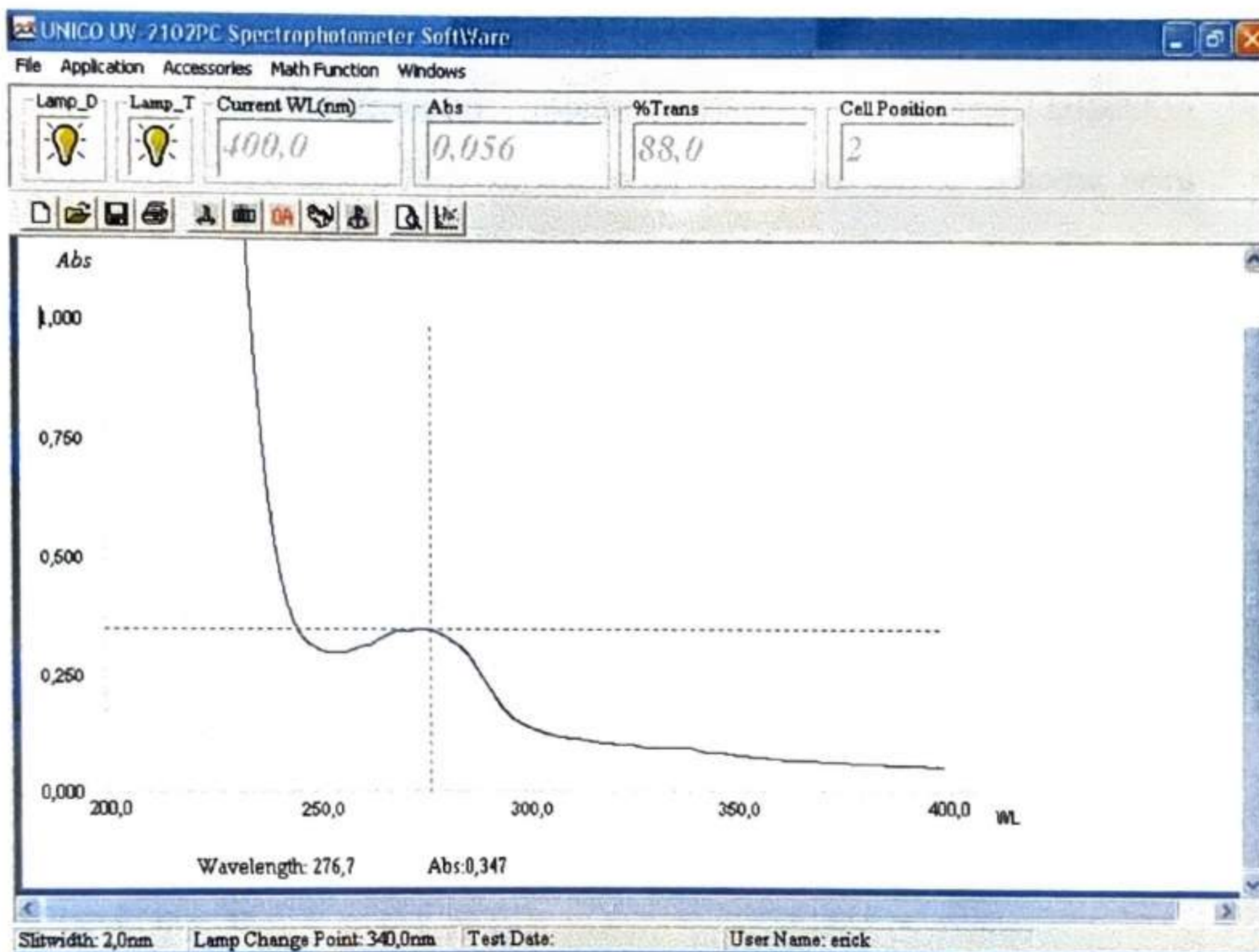


FIGURA N° 18 : SCREENING DE ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR ÁCIDO.

(ABS 279 nm = 0,3320)

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro n° 19, el análisis de varianza para las absorbancias, muestra que a un nivel de confianza del 95 % los métodos de obtención de albúmina sérica bovina presentan diferencias significativas entre sus medias, y según la prueba de significancia de Tukey HSD muestra que los métodos de precipitación por ácido y

termocoagulación selectiva, así como la de precipitación por sales y termocoagulación selectiva, presentan diferencia estadística significativa. Mientras que entre las medias de los métodos entre precipitación por ácido y precipitación por sales no existe diferencia significativa, como se observa en la figura n° 19. Siendo la de mayor absorbancia la que corresponde al método de termocoagulación selectiva con un valor de 0,6723; seguido del método de precipitación por sales con un valor de 0,4164 y finalmente el método de precipitación por ácido con un valor de 0,3321.

CUADRO N° 19 : ANÁLISIS DE VARIANZA PARA ABSORBANCIA A DIFERENTES MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

Fuente de Varlación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F Calculado	F Tabla
Técnicas	0,251092	2	0,125546	11,7877	4,26
Error	0,0958557	9	0,01065063		
Total	0,3469477	11			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

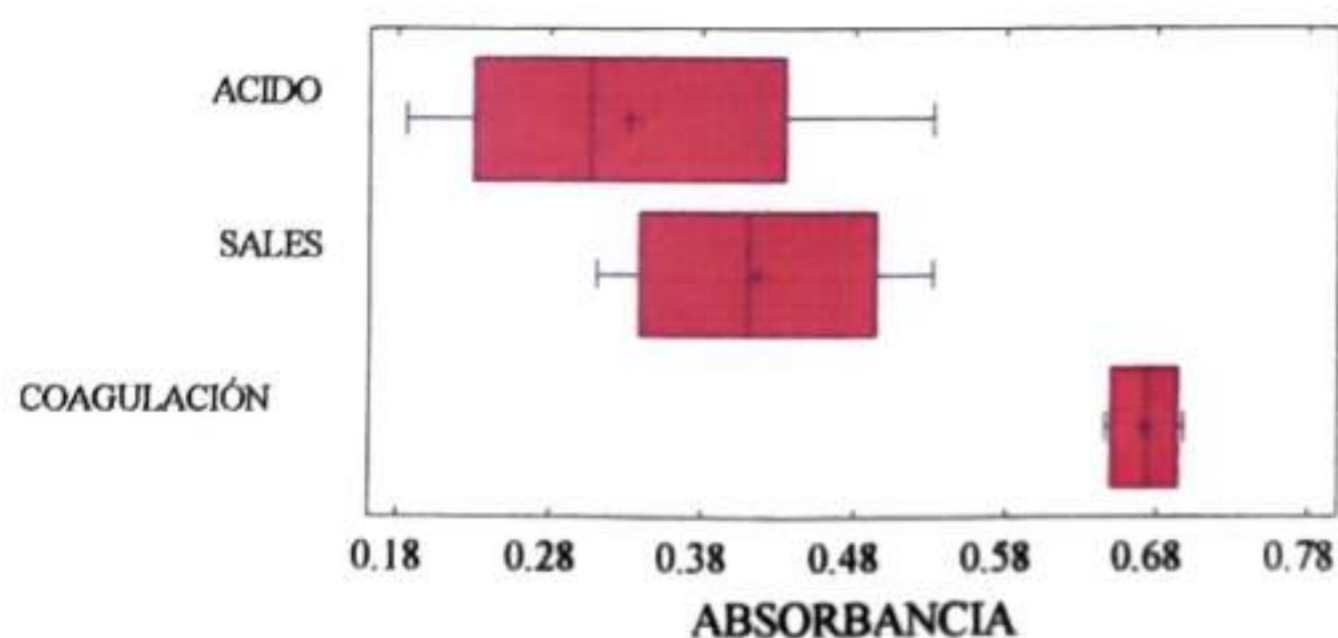


FIGURA N° 19 : DISEÑO DE CAJA PARA LAS MEDIAS, MEDIANA Y DESVIACIÓN DE MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.3.2. Resultados de la electroforesis

Los resultados obtenidos por la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se muestran en las siguientes figuras.

En la figura n° 20, se muestra la presencia de las albúminas obtenidas por los tres diferentes métodos de extracción, en comparación con el patrón de albúmina Sigma Aldrich de código (AS1 y AS2).

La figura n° 20, muestra una semejanza en el comportamiento entre las albúminas obtenidas por termocoagulación (C1 y C2) y las del patrón (AS1 y AS2) , a diferencia de las otras dos obtenidas por precipitación por ácidos(D1 y D2) y precipitación por sales (S1 y S2), las cuales muestran una pequeña zona coloreada de azul; por lo cual se puede interpretar como una mínima cantidad de proteína

presente, dato que se demuestra con el screening anteriormente realizado.

Otro dato importante de anotar es que las proteínas se desplazaron en un mismo nivel horizontal, dato que comprueba que se trata de la misma proteína con un peso molecular idéntico.

Las albúminas obtenidas por el método de termocoagulación selectiva y las albúminas patrón Sigma Aldrich presentan características idénticas de recorrido electroforético y de intensidad de teñido por el colorante azul de coomasie. También se puede visualizar que entre las proteínas obtenidas por los tres métodos no se encontró presencia de la proteína hemoglobina, que se muestran con los códigos H1 y H2.

En el caso de la albúmina obtenida por el método de precipitación por sales, que anteriormente fue la que presentó mayor rendimiento, se puede decir por medio de este análisis electroforético que el rendimiento elevado fue por causa de presencia excesiva de sales de sulfato de amonio detectadas visualmente en la etapa de cristalización, debido a que no presenta la misma intensidad de teñido que la albúmina patrón Sigma Aldrich.

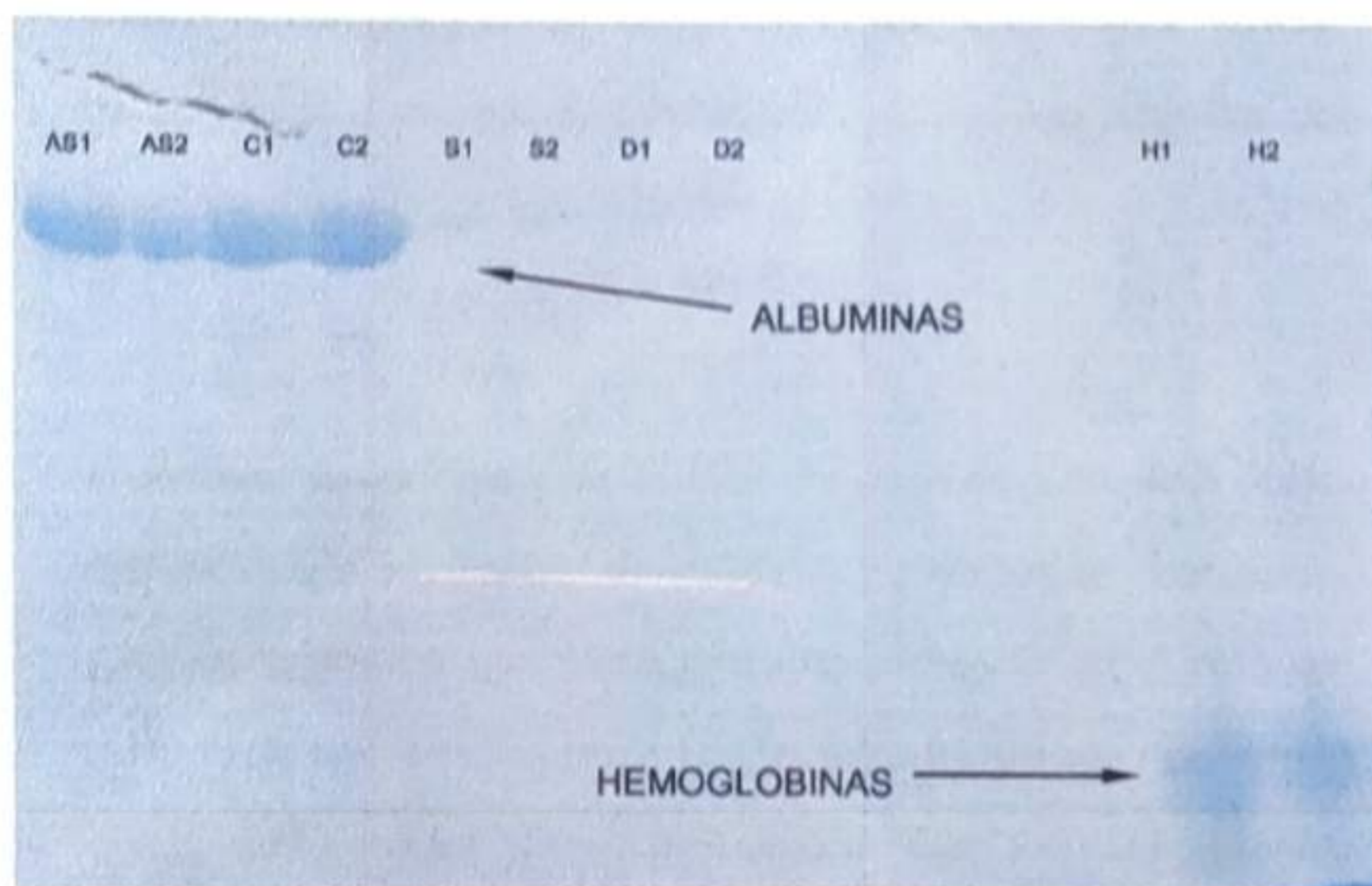


FIGURA N ° 20 : ELECTROFORESIS DE ALBÚMINAS OBTENIDAS POR LOS TRES MÉTODOS. (PAGE-SDS (STAKING 5%, SEPARACIÓN 12%) BUFFER DE CORRIDA TRIS-GLICINA-SDS 1X, 160 V, 25 A, TIEMPO 3:00 H, MUESTRA 20 UL.) **AS1 Y AS2:** ALBÚMINA PATRÓN MARCA SIGMA ALDRICH; **C1 Y C2:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACIÓN SELECTIVA; **B1 Y B2:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES; **D1 Y D2:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN ÁCIDA; **H1 Y H2** HEMOGLOBINA BOVINA. FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura 21, se muestra la semejanza del desarrollo de la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva (C4) y la albúmina perteneciente al patrón de Sigma Aldrich (AS). En las cuales también se observan presencia de otras proteínas que pertenecen al

grupo de las globulinas; que ciertamente guardan mucha similitud entre el patrón (AS) y el método de termocoagulación selectiva (C4). La ubicación al mismo nivel horizontal del recorrido entre las dos proteínas (C4) y (AS) demuestra que se trata de una misma proteína con un mismo peso molecular.

Al observar los resultados de las otras dos proteínas obtenidas por los métodos de precipitación por sales (S4) y precipitación por ácidos (D4), se demuestra que existe pequeña presencia en el caso del método de precipitación por sales (S4), esto debido a la baja tinción que presenta con el colorante azul de coomasie; y la nula presencia de proteína obtenida por el método de precipitación por ácido (D4).

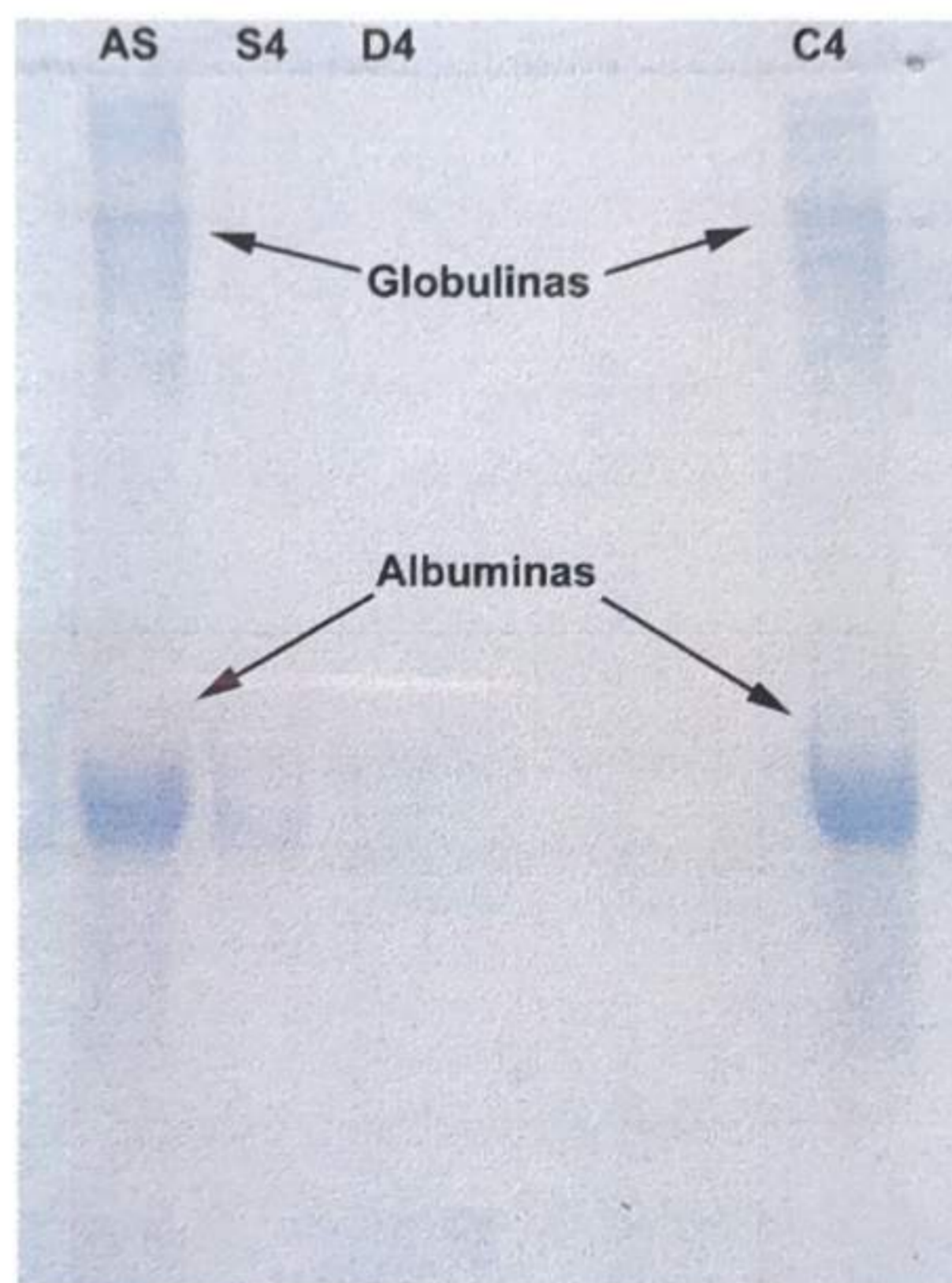


FIGURA N° 21 : ELECTROFORESIS DE ALBÚMINAS (PAGE-SDS (GEL STAKING 6%, GEL SEPARACIÓN 12%) BUFFER DE CORRIDA TRIS-GLICINA-SDS 1X, 200 V, 30 A, TIEMPO 4:20 H, MUESTRA 20 UL.) **AS:** ALBÚMINA PATRÓN MARCA SIGMA ALDRICH; **C4:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACIÓN SELECTIVA; **S4:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES, **D4:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN ÁCIDA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.4. Resultados de la segunda evaluación

5.4.1. Nitrógeno total

Se realizó la evaluación de nitrógeno total para el método de termocoagulación selectiva teniendo como resultado los siguientes datos: gasto final en la titulación con ácido sulfúrico de 44 ml a lo que corresponde un 15,323 % de nitrógeno total; encontrándose dentro del rango permitido.

5.4.2. Cenizas

Este análisis se efectuó para el método de termocoagulación selectiva, teniendo como resultado 0,33 % de ceniza; verificando que el dato obtenido esta dentro del rango permitido.

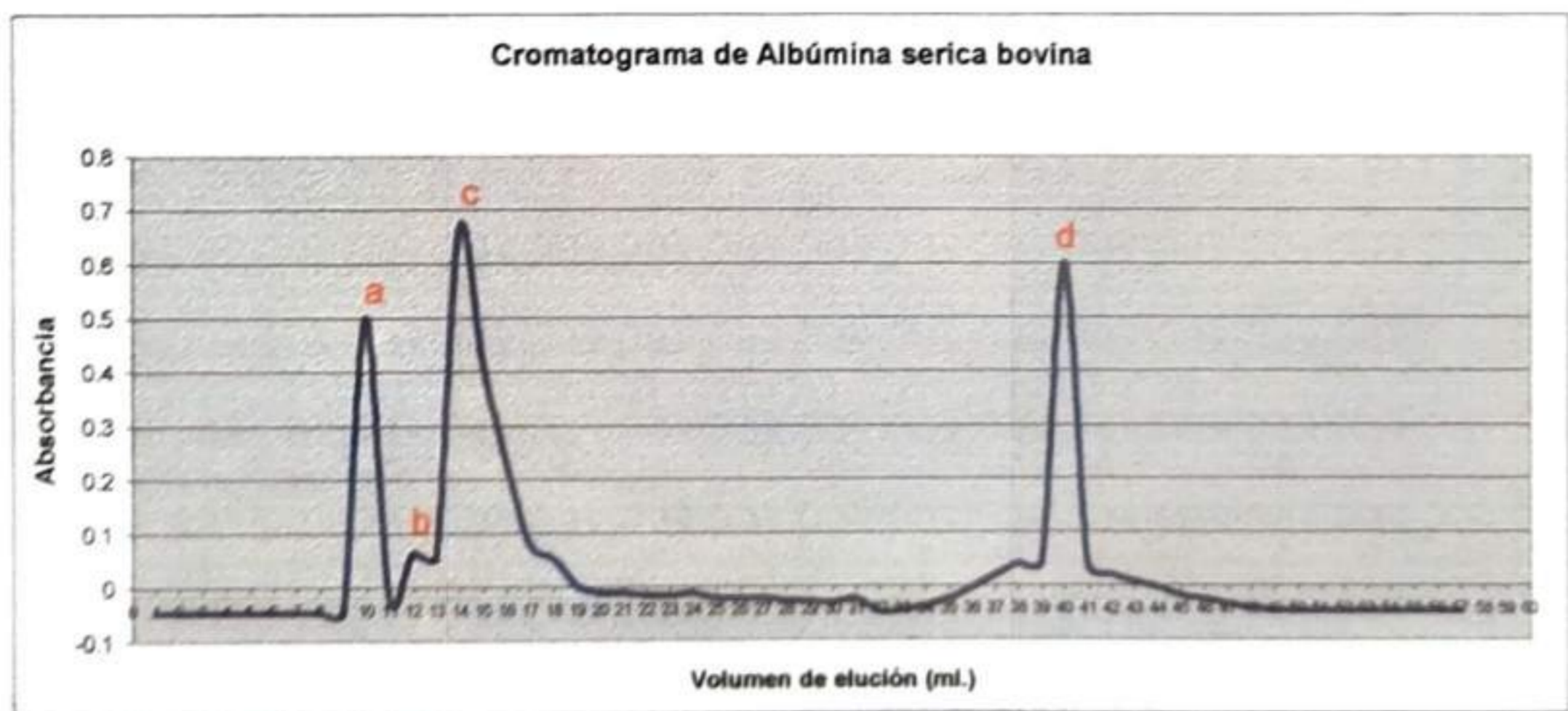
5.4.3. Análisis del pH en solución 1% en Cloruro de sodio 0,15 M

Este análisis también se efectuó para evaluar las albúminas obtenidas por el método de termocoagulación selectiva teniendo como resultado final un pH igual a 6,2; este dato también se encuentra dentro de los rangos permitidos.

5.5. Resultados de la purificación por cromatografía de filtración en gel

Se realizó la cromatografía en filtración en gel de sephadex G-75, cuyos datos se tabularon y plasmaron en una curva llamada cromatograma y se representa en la figura nº 22, en donde se observan las absorbancias y

volúmenes de elución, estos volúmenes se recogieron con una velocidad de elución constante de 1 ml/5 min. El primer pico letra (a), ubicado en el volumen de elución del tubo n° 10, corresponde al azul dextrano cuyo peso molecular es de 2000000 g/mol, el segundo pico letra (b), ubicado en el volumen de elución del tubo n° 12 corresponde a las globulinas cuyo peso molecular es de 80000 g/mol, el tercer pico letra (c), corresponde a el volumen de elución del tubo n° 14, seguido del n° 15, los cuales representan a la albúmina sérica bovina cuyo peso molecular es 66000 g/mol, y el último pico letra (d), correspondiente al volumen de elución del tubo n° 40 pertenece al del rojo de fenol cuyo peso molecular es de 354,8 g/mol.



**FIGURA N° 22 : CROMATOGRAMA DE ALBÚMINA SERICA BOVINA, OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACION SELECTIVA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA**

5.5.1. Resultado del Screening después de la cromatografía

En la figura n° 23, se representa el barrido espectrofotométrico (screening), evaluada a partir de 200 nm hasta 400 nm de longitud de onda; tomando datos de las absorbancias cada 0,1 nm. Realizado a la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva en solución (1mg/ml), la medición se realizó en una cubeta de cuarzo 3,5 ml de capacidad; el barrido espectrofotométrico se visualizó mediante un software UNICO UV 2102 PC Spectrophotometer. Esta prueba se efectuó después de haber sido purificada por la cromatografía en filtración en del de sephadex G-75, en la cual se observa una curva muy parecida a la albúmina patrón sigma Aldrich; obteniendo un pico de absorbancia máxima de 0.6807 en los 279 nm de longitud de onda; a la cual por medio de una comparación con el patrón se le designa una pureza de 99,98 %; lo que nos indica que existe una eliminación de las proteínas contaminantes.

Se puede señalar que mediante el método de termocoagulación selectiva se obtienen albúminas muy semejantes a las del patrón Sigma Aldrich; lo que nos indica que no sería necesaria la purificación por cromatografía para alcanzar la pureza comercial; determinando así que el método de termocoagulación selectiva es el mejor método de purificación de albúmina sérica bovina ya que presenta iguales características al patrón en el barrido espectrofotométrico.

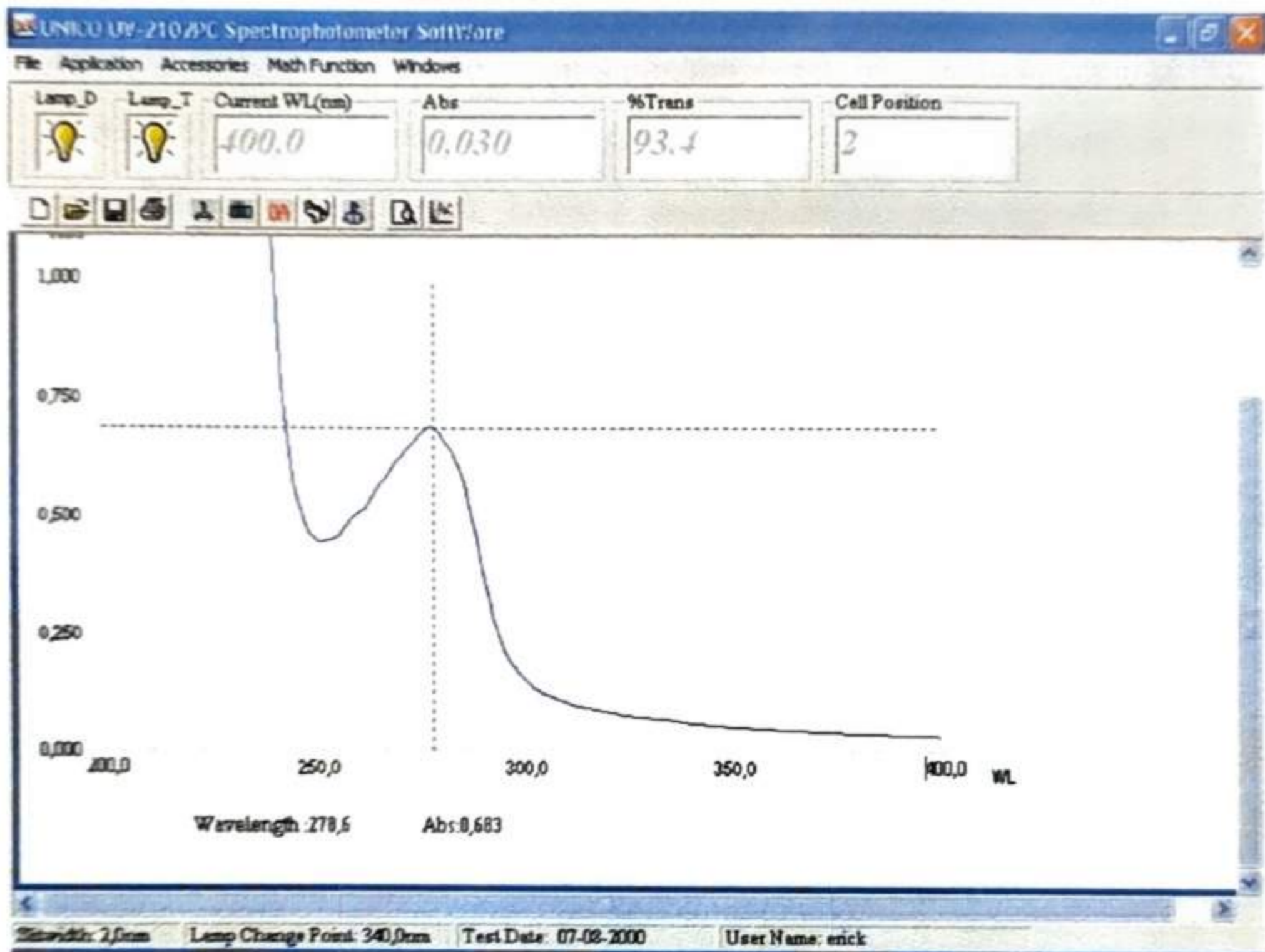


FIGURA Nº 23 : SCREENING REALIZADO A ALBÚMINA SÉRICA BOVINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACIÓN SELECTIVA, DESPUÉS DE LA CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL. **(ABS 279 nm= 0,6807)**
 FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

5.5.2. Resultado de la electroforesis después de la cromatografía

En la figura nº 24, se observa la electroforesis SDS-PAGE, realizada para la evaluación de la albúmina sérica bovina obtenida por el método de termocoagulación selectiva, antes y después de la cromatografía en filtración por gel de sephadex G-75, en la cual se percibe una eliminación total de las globulinas debido a la cromatografía de filtración en gel, realizada a la albúmina obtenida por el método de termocoagulación (C), dando como resultado (CC1 y CC2). Demostrando de esta manera que es posible obtener albúmina sérica bovina de mayor grado de pureza, en comparación a la que presenta el patrón Sigma Aldrich.

También se observan las albúminas obtenidas por los métodos de precipitación por sales y precipitación por ácidos las cuales están representadas por tinciones poco apreciables, indicando esto una menor o pequeña cantidad de proteína aislada.

Según la figura nº 24 se puede decir que la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva presenta iguales características electroforéticas en cuanto al recorrido y intensidad de tinción; por lo tanto se trataría de la misma proteína comparada con la albúmina patrón Sigma Aldrich.

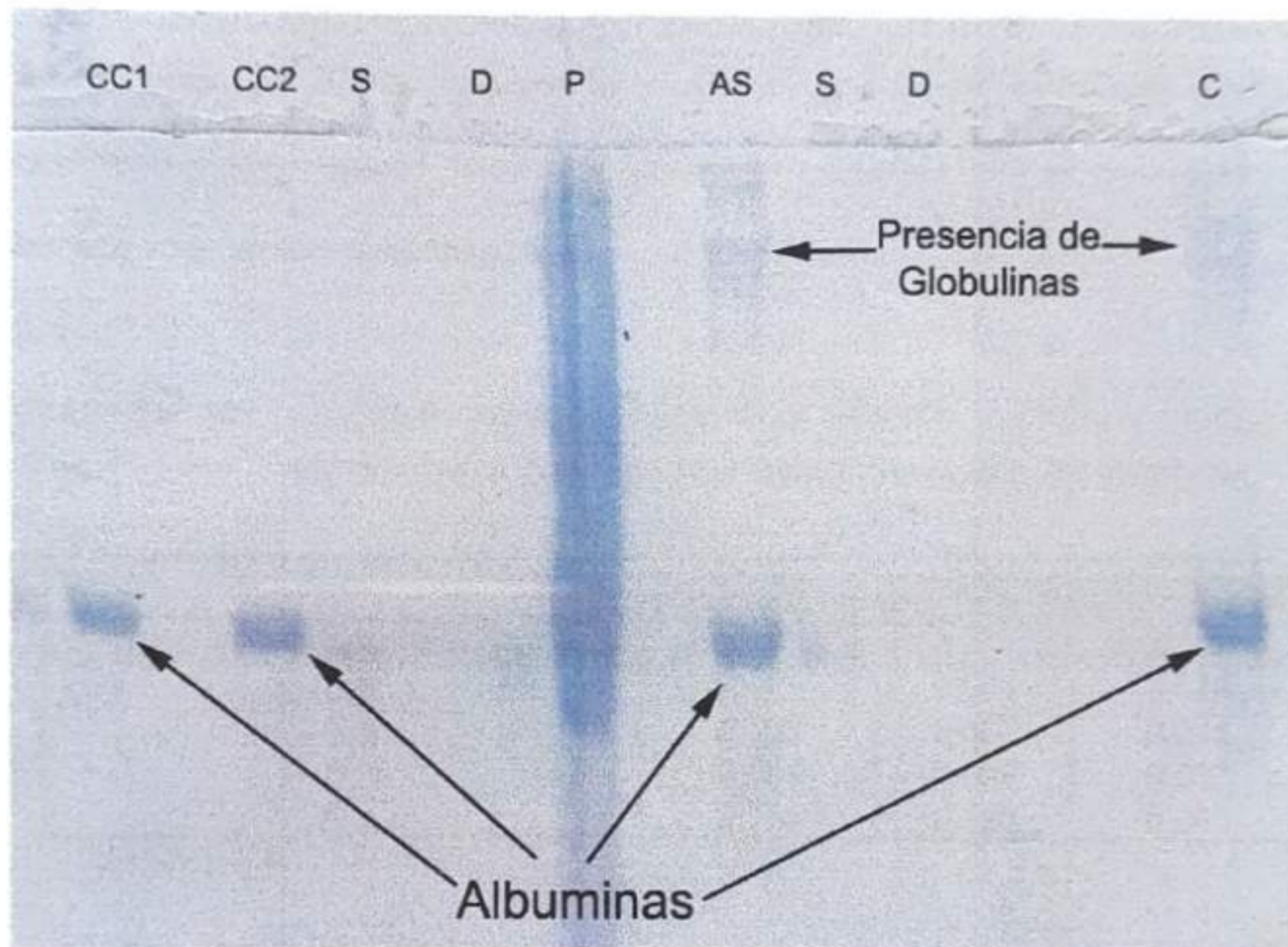


FIGURA N° 24 : ELECTROFORESIS ANTES Y DESPUÉS DE LA CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL DEL MÉTODO DE TERMOCOAGULACION SELECTIVA. (PAGE-SDS (STAKING 6%, SEPARACIÓN 12%) BUFFER DE CORRIDA TRIS-GLICINA-SDS 1X, 200 V, 30 A, TIEMPO 4:20 H, MUESTRA 20 UL.)

CC1 Y CC2: ALBÚMINA OBTENIDA POR TERMOCOAGULACION SELECTIVA, DESPUÉS DE LA PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL;
S: ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR SALES; **D:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN POR ÁCIDO; **P:** PLASMA BOVINO; **AS:** ALBÚMINA PATRÓN MARCA SIGMA ALDRICH; **C:** ALBÚMINA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACION SELECTIVA.
 FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

5.5.3. Resultado de la aplicación de la prueba Lowry

En el cuadro n° 20, se aprecian los datos registrados de comparación de albúmina patrón sigma Aldrich y albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva.

CUADRO N° 20: ABSORBANCIA REGISTRADA PARA MUESTRA PATRÓN Y MUESTRA EXPERIMENTAL OBTENIDA POR TERMOCOAGULACION SELECTIVA.

Concentraciones	ABSORBANCIA		
	muestra	patrón	diferencia
0,1	0,283	0,301	0,018
0,2	0,465	0,507	0,042
0,3	0,641	0,698	0,057
0,4	0,728	0,788	0,060

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En el cuadro n° 21, la evaluación de datos de albúminas en la aplicación del método de Lowry para proteínas se muestra que sus coeficientes de variación presentan valores muy similares de amplitud de dispersión; es decir ambas técnicas ofrecen el mismo grado de exactitud. Dichos resultados se confirmaron mediante una prueba de hipótesis de las medias, en la cual no se encontraron diferencias significativas para la precisión de las muestras

CUADRO N° 21 : MEDIAS DE POSICIÓN Y DISPERSIÓN, PARA LAS CURVAS LOWRY.

Medidas de Posición y Dispersión	ABSORBANCIA		
	muestra	patrón	diferencia
promedio (x)	0,5293	0,5735	0,0443
desviación normal (s)	0,1973	0,2162	0,0192
coeficiente de variación (c.v.)	37,28%	37,69%	43,37%

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

Se realizó un análisis para verificar alguna diferencia existente entre la proteína obtenida por el método de termocoagulación selectiva y la proteína patrón obtenida del laboratorio Sigma Aldrich, para las cuales se les construyeron de manera independiente sus curvas de calibración, en la figura n° 25 se muestra la curva hallada con la albúmina patrón marca Sigma Aldrich, en la cual se puede observar que su coeficiente de Determinación es de 0,9734, con un coeficiente de correlación lineal de 0,9866 lo que nos indica que existe un alta relación lineal entre los niveles de concentración de albúmina y absorbancia.

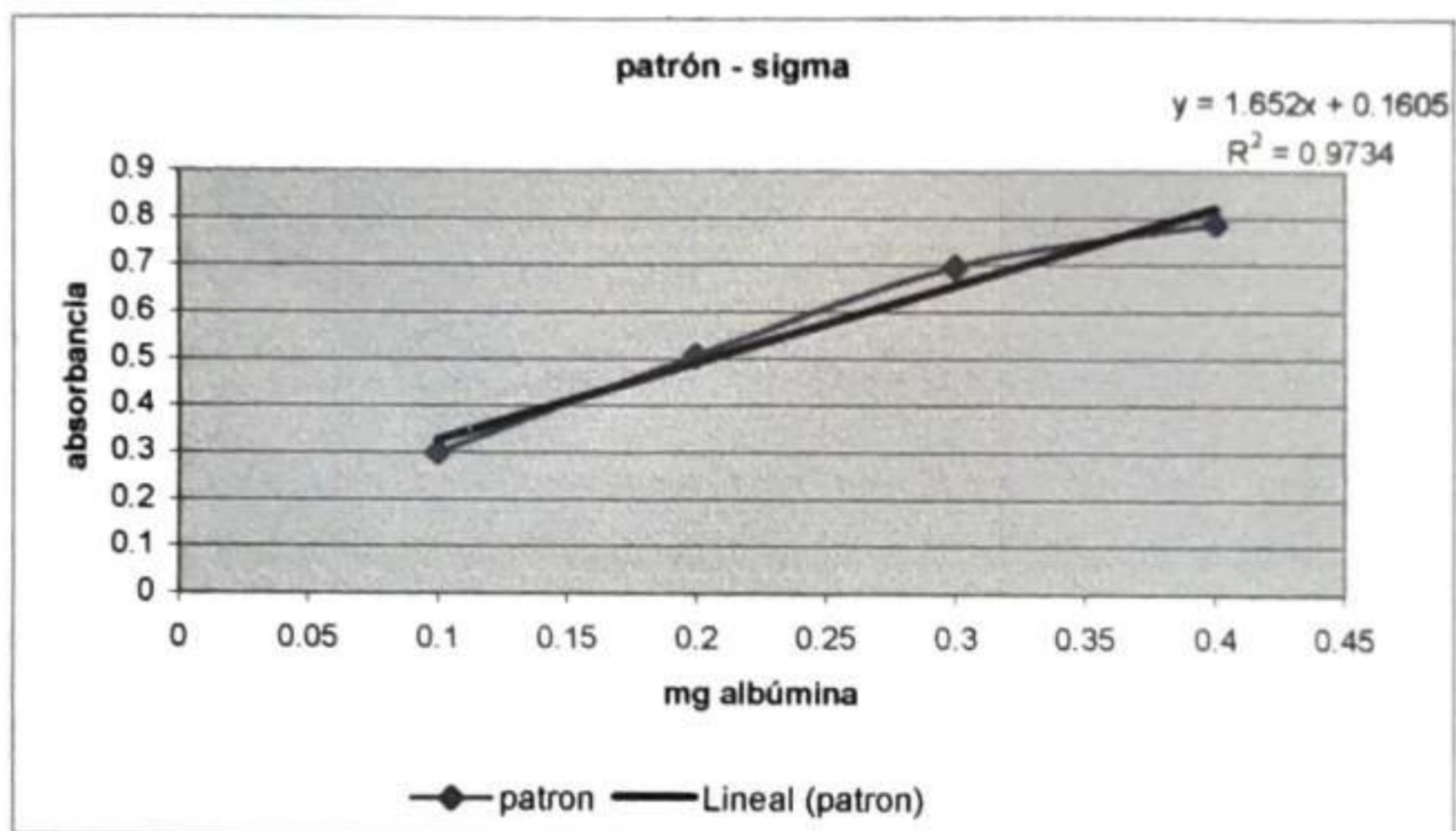


FIGURA N° 25 : CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA ALBÚMINA SÉRICA PATRÓN MARCA SIGMA ALDRICH.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

En la figura n° 26 se observa la curva de calibración hallada para la albúmina obtenida por el método de termocoagulación selectiva, en donde se obtiene el coeficiente de determinación que es de 0,9777, con un coeficiente de correlación de 0,9888 lo que indica un comportamiento lineal entre los niveles de concentración de albúmina y absorbancia.

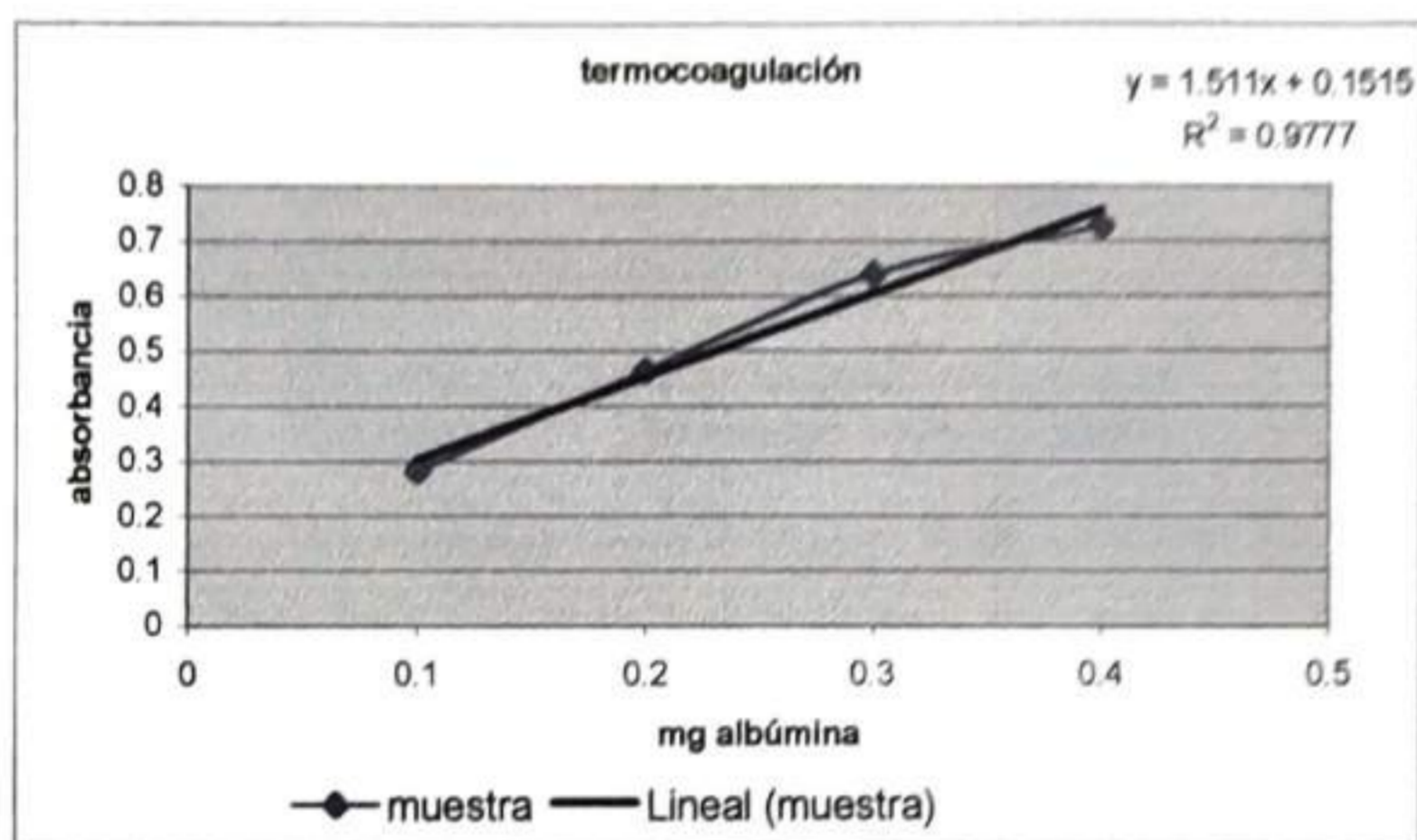


FIGURA N° 26 : CURVA DE CALIBRACIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA OBTENIDA POR EL MÉTODO DE TERMOCOAGULACION SELECTIVA.
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA.

5.5.3.1. Prueba de hipótesis para evaluación de albúmina muestra (Termocoagulación selectiva) y Albúmina Patrón (Sigma Aldrich)

Según el análisis de la prueba t cuyo resumen se muestra en el cuadro n° 22, con un nivel de significancia de 0,05 la prueba de Hipótesis demuestra que no existe razón suficiente para afirmar que la albúmina obtenida por termocoagulación selectiva es diferente de la albúmina patrón proporcionada por Sigma Aldrich ya que el error P (0,77255), es mucho mayor que el nivel de significancia (0,05), en decir aceptamos la hipótesis nula H_0 , por lo tanto se puede afirmar que ambas proteínas se comportan por igual en la prueba de Lowry.

CUADRO N° 22 : PRUEBA t STUDENT PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS

Prueba t de comparación de medias	
Hipótesis Nula (Ho) :	μ termocoagulación = μ patrón
Hipótesis Alternativa (Hi) :	μ termocoagulación \neq μ patrón
asumiendo varianzas iguales: texp = -0,302401 P-value = 0,772555	

FUENTE : ELABORACIÓN PROPIA

5.5.4. Resultado del análisis del rendimiento después de la cromatografía

Después de realizada la cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75, es necesario determinar el rendimiento obtenido, debido a que cuando se realiza una purificación por lo general existen pérdidas. Por lo tanto se realiza el siguiente análisis:

- 1.- Albúmina solución inicial 60 mg/ml
- 2.- Volumen adicionado a la columna de cromatográfica 0,3ml (0,3 ml * 60 mg/1ml) que contiene 18 mg de albúmina.
- 3.- Se recogió 1ml de volumen de elusión y se le adiciono 2ml de buffer y se procedió a realizar un análisis de Lowry para la cual se tomo 0,2 ml de los 3 ml totales del tubo n° 14 de la elusión, la absorbancia = 0,265.

- 4.- De acuerdo al análisis realizado en 0,2 ml existen 0,202 mg de proteína. Entonces en 0,2 ml hay 0,202 mg en 3 ml hay 3 mg; entonces 1 ml de elución original contiene 9 mg de proteína.
- 5.- El mismo procedimiento se sigue con el tubo n° 15 en donde se encontró que contiene 6,12 mg de proteína.
- 6.- Los tubos 14 y 15 fueron considerados mirando el cromatograma de la figura n° 22. Juntos representan en la totalidad de proteína obtenida y representa directamente el rendimiento, la suma de estos dos tubos da un total de 15,12 mg de proteína, el cual representa un 84 % de rendimiento final de albúmina sérica bovina purificada.

VI CONCLUSIONES

- 1.- De acuerdo al estudio realizado, las mejores condiciones para la obtención del plasma bovino fueron: una velocidad de centrifugación de 4500 rpm, un tiempo de centrifugado de 20 minutos y adición de citrato de sodio-oxalato de amonio al 0,4 % como anticoagulante. Obteniéndose como resultados un valor máximo de rendimiento de 47,315 % y una hemólisis expresada como un valor mínimo de absorbancia de 0,436.
- 2.- De los resultados experimentales obtenidos de los tres métodos de extracción de albúmina sérica bovina, el que reportó características similares al patrón Sigma Aldrich, fue método de termocoagulación selectiva y reportó los siguientes resultados: rendimiento de 24 g/l plasma; pureza 98,75 %, nitrógeno total de 15,323 %, cenizas de 0,33 %, humedad 4,79 %.
- 3.- Las pruebas electroforéticas realizadas a los tres métodos de obtención de albúmina sérica bovina, determinó que la albúmina obtenida por termocoagulación selectiva presentó iguales características de recorrido electroforético y presencia de globulinas que la albúmina patrón Sigma Aldrich.

- 4.- La cromatografía de filtración en gel de sephadex G-75; dió como resultado un grado de pureza del 99,9 %; con un rendimiento del 84 % de proteína pura. Además la electroforesis en gel de poliacrilamida demostró ausencia de proteínas contaminantes.

- 5.- Ambas proteínas, mostraron un comportamiento similar en el ajuste de las curvas de calibración para cuantificación de proteínas por el método Lowry, de acuerdo a la evaluación de la prueba de hipótesis de comparación de medias.

VII RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda realizar un estudio completo a las proteínas que no fueron de interés de este trabajo como son: globulinas y fibrinógenos; para el aprovechamiento de los componentes aminoacídicos mas importantes y su aplicación en la industria de la alimentación.
- 2.- Realizar un estudio riguroso de la estabilización térmica de la albúmina sérica bovina en el método de termocoagulación selectiva, con el fin de disminuir los costos de producción.
- 3.- Realizar estudios para la aplicación de la albúmina sérica bovina aprovechando su capacidad espumante en embutidos, principalmente en la capacidad de retención de agua.
- 4.- Se recomienda realizar un estudio para el aprovechamiento alimentario del hierro presente en la hemoglobina de los corpúsculos rojos de la sangre.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. **AMÁRITA FELIX (2000)** Técnicas de Análisis en Bioquímica, Universidad del País Vasco, Bilbao España.
Vinculado a <http://www.galeon.com/lactobacilo/tecnicas.htm>
2. **BOX, G.E.P, WILSON, K.B. (1951)** On the Experimental Attainment of Optimum Condition, Journal Royal Statistic.
3. **BOX, G.E.P; WETZ (1973)** Criteria for Judging Adequacy of Estimation by Approximate Response Function, University of Wisconsin.
4. **BROWN J.R. (1975)** Interaction of wsp with Bovine Serum Albumin (BSA), New York USA.
Vinculado a <http://www.friedli.com/research/phd/bsa/albumin.html>.
5. **CHEFTEL S.C. (1989)** Proteínas Alimentarias, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España.
6. **EARLE R.L. (1979)** Ingeniería de los Alimentos, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España.
7. **FREIFELDER D. (1991)** Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular, Editorial Reverté, Barcelona España.
8. **GANONG WILLIAM (1996)** Manual de Fisiología, Editorial El Manual Moderno, México DF.
Vinculado a <http://es.encarta.msn.com/enciclopedia/sangre.html>.

9. **GARCÍA-SEGURA JUAN MANUEL (1996)** Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica, Editorial Síntesis S.A, Madrid España.
10. **HARRISON C. (2002)** Principios de medicina interna, Editorial McGraw-Hill Ineramericana, Madrid España.
11. **HARPER (2001)** Bioquímica, Editorial El Manual Moderno, México DF.
12. **JAMES F. PRICE (1994)** Ciencia de la Carne y Productos Cárnicos, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España.
13. **LEHNINGER L. ALBERT (1987)** Bioquímica Las Bases Moleculares y Función Celular, Editorial Omega S.A, Barcelona España.
14. **MADRID ANTONIO (1999)** Aprovechamiento de los Subproductos Cárnicos, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid España.
15. **MOYA ANIEL, PAZ ORFANI (2000)** Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización, Universidad de la Habana, La Habana Cuba. Pág. 10-15.
16. **MONGOMERY, DOUGLAS (1985)** Diseños Experimentales, Editorial Iberoamericana, México DF.
17. **PEARSON D. (1986)** Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España.
18. **PETERS T. (1985)** Serum Albumin, Clinical Chemistry, Vol 23 N°1 New York USA.

19. **PÉREZ ALBARSANZ, MIGUEL (2004)** Practicas de Bioquímica, Universidad de Alcalá, Madrid España.
20. **BORNÁZ, SOLEDAD (1995)** Propiedades de las Proteínas I, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna Perú.
21. **RASTON LAWRIE (1994)** Avances de la Ciencia de la Carne, Editorial Acribia S.A, Zaragoza España.
22. **RENDINA GEORGE (1974)** Técnicas de Bioquímica Aplicada, Editorial Interamericana, México D.F.
23. **REYNA MANUEL (2003)** Practicas de Biología Celular, Universidad de Barcelona, Barcelona España.
24. **SILVA, R.S; BORSATO, D. (1985)** Análisis de Biosistemas a través de Delineamiento Factorial: Optimizacáo Pelo Super Simples Modificado.
25. **TANAKA K. (1991)** Purification of Human Albumin by the Combination of Method of Cohn whit Liquid Chromatography, ESCIELO, Sao Paulo Brazil. Vinculado a <http://www.scielo.br/scielo.php?pid>.
26. **TELLEZ VILLENA JOSÉ (1992)** Tecnología de Industrias Cárnicas, Editorial Artes Gráficas Espino, Lima Perú.
27. **VÉLEZ DÍAZ, ANA (1994)** Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida, Universidad de Puerto Rico, Mayagüez Puerto Rico. Vinculado a <http://www.uprm.edu/biology/profs/velez/poli.htm>.
28. **VILLAVICENCIO NUÑEZ MARINO (1999)** Bioquímica, Fondo Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú .

29. **YÁBAR V. CARLOS (2003)** Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN, Instituto Nacional de Salud, División de Biología Molecular, Lima Perú.

IX ANEXOS

ANEXO I: Análisis de varianza para el rendimiento y absorbancia para el anticoagulante citrato-oxalato 0,4 % (etapa preliminar).

Regr. Coefficients; Var.:RENDIM; R-sqr=.96875; Adj:.93749
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0833333

RENDIMIENTO

	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95% Cnf.Limt	+95% Cnf.Limt
Mean/Interc.	44.63158	.148087	301.3871	.000011	43.99441	45.26875
(1)VELOC (L)	4.25000	.117851	36.0624	.000268	3.74293	4.75707
VELOC (Q)	-1.32895	.181349	-7.3273	.018121	-2.10932	-.54858
(2)TIEMPO (L)	1.66667	.117851	14.1421	.004963	1.15959	2.17374
TIEMPO (Q)	-.07895	.181349	-.4353	.705826	-.85932	.70142
1L by 2L	-.75000	.144338	-5.1962	.035099	-1.37103	-.12897

ANOVA; Var.:RENDIM; R-sqr=.96875; Adj:.93749 (erick.sta)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0833333

RENDIMIENTO

	SS	df	MS	F	p
(1)VELOC (L)	108.3750	1	108.3750	1300.500	.000768
VELOC (Q)	4.4741	1	4.4741	53.689	.018121
(2)TIEMPO (L)	16.6667	1	16.6667	200.000	.004963
TIEMPO (Q)	.0158	1	.0158	.189	.705826
1L by 2L	2.2500	1	2.2500	27.000	.035099
Lack of Fit	4.1009	3	1.3670	16.404	.058006
Pure Error	.1667	2	.0833		
Total SS	136.5455	10			

Regr. Coefficients; Var.:ABSORB; R-sqr=.99402; Adj:.98805
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.000007

ABSORBANCIA

	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95% Cnf.Limt	+95% Cnf.Limt
Mean/Interc.	.474842	.001357	349.8582	.000008	.469002	.480682
(1)VELOC (L)	-.078000	.001080	-72.2140	.000192	-.082647	-.073353
VELOC (Q)	.039895	.001662	24.0001	.001732	.032743	.047047
(2)TIEMPO (L)	-.050833	.001080	-47.0625	.000451	-.055481	-.046186
TIEMPO (Q)	-.002605	.001662	-1.5673	.257567	-.009757	.004547
1L by 2L	.038250	.001323	28.9143	.001194	.032558	.043942

ANOVA; Var.:ABSORB; R-sqr=.99402; Adj:.98805 (erick.sta)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.000007

ABSORBANCIA

	SS	df	MS	F	p
(1)VELOC (L)	.036504	1	.036504	5214.857	.000192
VELOC (Q)	.004032	1	.004032	576.004	.001732
(2)TIEMPO (L)	.015504	1	.015504	2214.881	.000451
TIEMPO (Q)	.000017	1	.000017	2.456	.257567
1L by 2L	.005852	1	.005852	836.036	.001194
Lack of Fit	.000359	3	.000120	17.104	.055741
Pure Error	.000014	2	.000007		
Total SS	.062442	10			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO II: Análisis de varianza para el rendimiento y absorbancia para el anticoagulante EDTA 0,4 % (etapa preliminar).

Regr. Coefficients: Var.:RENDIM; R-sqr=.95119; Adj.:90237
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0933333

RENDIMIENTO

	Regressn	Std.Err.			-95%	+95%
	Coeff.	Pure Err	t(2)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	42.76316	.156721	272.8621	.000013	42.08884	43.43747
(1)VELOC (L)	3.05000	.124722	24.4544	.001668	2.51336	3.58664
VELOC (Q)	-2.10789	.191943	-10.9819	.008190	-2.93376	-1.28203
(2)TIEMPO (L)	1.55000	.124722	12.4276	.006413	1.01336	2.08664
TIEMPO (Q)	.09211	.191943	.4799	.678683	-.73376	.91797
1L by 2L	-1.87500	.152753	-12.2748	.006572	-2.53224	-1.21776

ANOVA: Var.:RENDIM; R-sqr=.95119; Adj.:90237 (erik1.sta)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0933333

RENDIMIENTO

	SS	df	MS	F	p
(1)VELOC (L)	55.8150	1	55.81500	598.0179	.001668
VELOC (Q)	11.2562	1	11.25616	120.6017	.008190
(2)TIEMPO (L)	14.4150	1	14.41500	154.4464	.006413
TIEMPO (Q)	.0215	1	.02149	.2303	.678683
1L by 2L	14.0625	1	14.06250	150.6696	.006572
Lack of Fit	4.7477	3	1.58256	16.9560	.056205
Pure Error	.1867	2	.09333		
Total SS	101.0855	10			

Regr. Coefficients: Var.:ABSORB; R-sqr=.932; Adj.:864
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0015213

ABSORBANCIA

	Regressn	Std.Err.			-95%	+95%
	Coeff.	Pure Err	t(2)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	.524316	.020009	26.20430	.001453	.438225	.610407
(1)VELOC (L)	-.074833	.015923	-4.69957	.042418	-.143346	-.006320
VELOC (Q)	.035711	.024506	1.45724	.282379	-.069729	.141150
(2)TIEMPO (L)	-.045500	.015923	-2.85742	.103761	-.114013	.023013
TIEMPO (Q)	-.010289	.024506	-.41988	.715379	-.115729	.095150
1L by 2L	.049500	.019502	2.53818	.126444	-.034411	.133411

ANOVA: Var.:ABSORB; R-sqr=.932; Adj.:864 (erik1.sta)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0015213

ABSORBANCIA

	SS	df	MS	F	p
(1)VELOC (L)	.033600	1	.033600	22.08600	.042418
VELOC (Q)	.003231	1	.003231	2.12354	.282379
(2)TIEMPO (L)	.012422	1	.012422	8.16488	.103761
TIEMPO (Q)	.000268	1	.000268	.17630	.715379
1L by 2L	.009801	1	.009801	6.44238	.126444
Lack of Fit	.001266	3	.000422	.27741	.840717
Pure Error	.003043	2	.001521		
Total SS	.063364	10			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO III: Análisis de varianza para rendimiento / absorbancia (LOG_R), para el anticoagulante citrato-oxalato 0,4 % (etapa preliminar).

Regr. Coefficients, Var.:LOG_R; R-sqr=.9908; Adj.:.98161
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0000303
RESPUESTA OPTIMIZADA: LOG_R

	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95, % Cnf Limit	+95, % Cnf Limit
Mean/Interc.	1,974042	,002822	699,6190	,000002	1,961902	1,986182
(1)VELOC (L)	,108133	,002245	48,1558	,000431	,098472	,117795
VELOC (Q)	-,045905	,003456	-13,2838	,005619	-,060774	-,031036
(2)TIEMPO (L)	,058967	,002245	26,2601	,001447	,049305	,068628
TIEMPO (Q)	,002595	,003456	,7508	,531065	-,012274	,017464
1L by 2L	-,035450	,002750	-12,8902	,005965	-,047283	-,023617

ANOVA, Var.:LOG_R; R-sqr=.9908; Adj.:.98161 (erik.sta)
2 factors, 1 Blocks, 11 Runs; MS Pure Error=.0000303
DV: LOG_R

	SS	df	MS	F	p
(1)VELOC (L)	,070157	1	,070157	2318,981	,000431
VELOC (Q)	,005338	1	,005338	176,459	,005619
(2)TIEMPO (L)	,020862	1	,020862	689,590	,001447
TIEMPO (Q)	,000017	1	,000017	,564	,531065
1L by 2L	,005027	1	,005027	166,157	,005965
Lack of Fit	,000883	3	,000294	9,729	,094638
Pure Error	,000061	2	,000030		
Total SS	,102582	10			

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO IV : Prueba de significancia Tukey HSD según stat graphics 5.0, para el rendimiento (Primera Evaluación).

Multiple Range Tests for ABS by TECNICAS
RENDIMIENTO

Method: 95.0 percent Tukey HSD

TECNICAS	Count	Mean	Homogeneous Groups
PP DIALISIS	4	18.0125	X
TERMOCUAGULACI	4	23.965	X
PP SALES	4	31.115	X

Contrast	Difference	+/- Limits
PP DIALISIS - PP SALES	*-13.1025	4.4828
PP DIALISIS - TERMOCUAGULACI	*-5.9525	4.4828
PP SALES - TERMOCUAGULACI	*7.15	4.4828

* denotes a statistically significant difference.

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO V : Prueba de significancia Tukey HSD según stat graphics 5.0, para la absorbancia (primera evaluación).

Multiple Range Tests for ABSORBANCIA by TECNICAS

Method: 95.0 percent Tukey HSD

TECNICAS	Count	Mean	Homogeneous Groups
ACIDO	4	0.332075	X
SALES	4	0.4164	X
TERMOCOAGULACIO4		0.672275	X

Contrast	Difference	+/- Limits
ACIDO - SALES	-0.084325	0.203723
ACIDO - TERMOCOAGULACION	*-0.3402	0.203723
SALES - TERMOCOAGULACION	*-0.255875	0.203723

* denotes a statistically significant difference.

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO VI : Prueba de significancia Tukey HSD según stat graphics 5.0, para la humedad (primera evaluación).

Multiple Range Tests for ABS by TECNICAS
HUMEDAD

Method: 95.0 percent Tukey HSD

TECNICAS	Count	Mean	Homogeneous Groups
PP SALES	4	2.975	X
TERMOCUAGULACI	4	4.75	X
PP DIALISIS	4	5.375	X

Contrast	Difference	+/- Limits
PP DIALISIS - PP SALES	*2.4	1.02889
PP DIALISIS - TERMOCUAGULACION	0.625	1.02889
PP SALES - TERMOCUAGULACI	*-1.775	1.02889

* denotes a statistically significant difference.

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO VII : Datos Obtenidos de la prueba de cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-75.

N° Tubos	Volumen eluido (ml)	Tiempo (min)	Volumen Acumulado (ml)	Absorbancia 280 nm	N° Tubos	Volumen eluido (ml)	Tiempo (min)	Volumen Acumulado (ml)	Absorbancia 280 nm
1	1	4.25	1	-0.047	30	1	5.2	30	-0.031
2	1	5.2	2	-0.047	31	1	5.2	31	-0.024
3	1	4.2	3	-0.047	32	1	5.2	32	-0.048
4	1	4.2	4	-0.047	33	1	5.2	33	-0.048
5	1	5.1	5	-0.047	34	1	5.2	34	-0.038
6	1	5.1	6	-0.047	35	1	5.2	35	-0.024
7	1	5.1	7	-0.047	36	1	5.2	36	-0.003
8	1	5.2	8	-0.047	37	1	5.2	37	0.019
9	1	5.2	9	-0.047	38	1	5.2	38	0.040
10	1	5.2	10	0.500	39	1	5.2	39	0.043
11	1	5.2	11	-0.025	40	1	5.2	40	0.800
12	1	5.2	12	0.065	41	1	5.3	41	0.037
13	1	5.2	13	0.057	42	1	5.2	42	0.020
14	1	5.2	14	0.665	43	1	5.2	43	0.007
15	1	5.2	15	0.418	44	1	5.2	44	-0.003
16	1	5.2	16	0.233	45	1	5.2	45	-0.019
17	1	5.25	17	0.080	46	1	5.2	46	-0.025
18	1	5.2	18	0.052	47	1	5.2	47	-0.035
19	1	5.2	19	0.003	48	1	5.2	48	-0.041
20	1	5.2	20	-0.013	49	1	5.2	49	-0.047
21	1	5.2	21	-0.012	50	1	5.2	50	-0.047
22	1	5.2	22	-0.017	51	1	5.2	51	-0.047
23	1	5.2	23	-0.017	52	1	5.2	52	-0.047
24	1	5.2	24	-0.014	53	1	5.4	53	-0.047
25	1	5.2	25	-0.021	54	1	5.4	54	-0.047
26	1	5.2	26	-0.023	55	1	5.4	55	-0.047
27	1	5.2	27	-0.022	56	1	5.2	56	-0.047
28	1	5.2	28	-0.027	57	1	5.2	57	-0.047
29	1	5.2	29	-0.029					

FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO VIII : Preparación de buffer para muestra 4X para electroforesis de proteínas.

Reactivos		Concentración final
Tris 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml.	0,125 M
SDS al 10 %	2,5 ml.	2,5 %
2-Mercaptoetanol	2,5 ml.	25 %
Glicerol	2,5 ml.	25 %
Azul de bromofenol	1 mg	0,1 mg/ml.

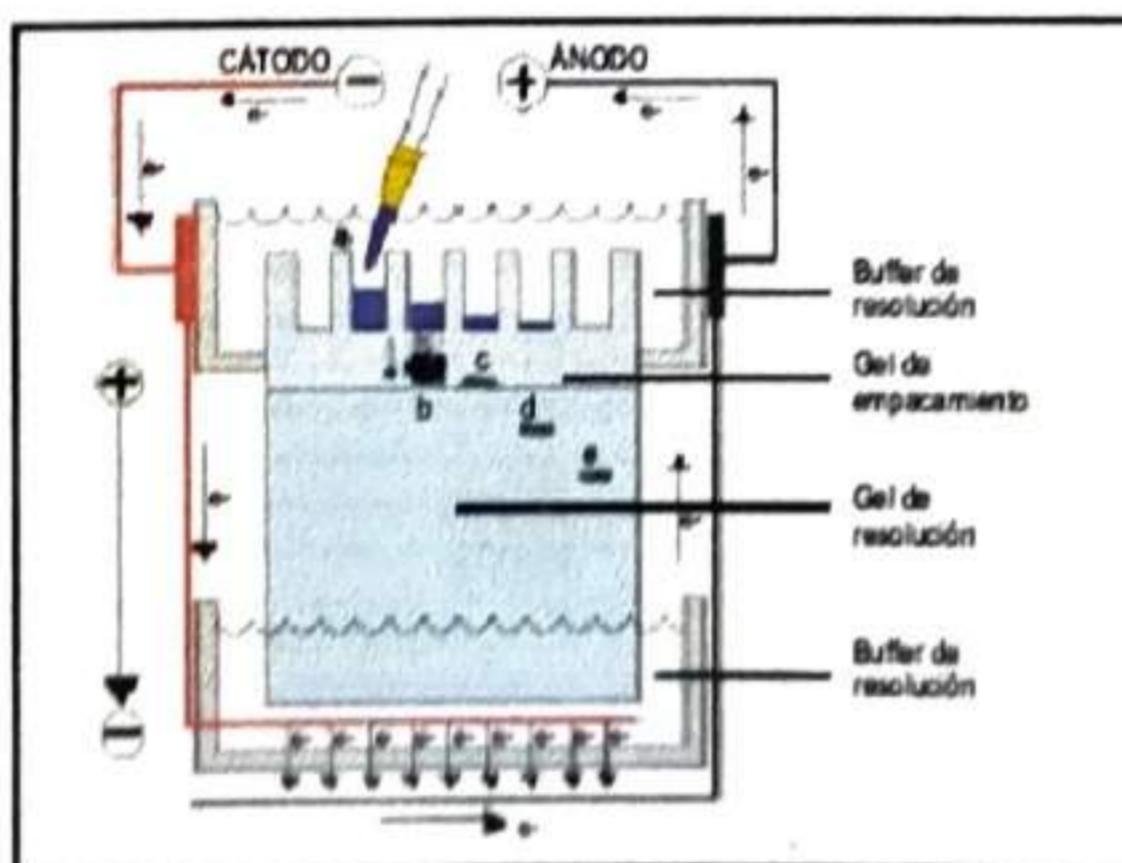
FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ANEXO IX : Preparación del buffer de corrida para electroforesis Tris-Glicina 10X para proteínas

Reactivos		Concentración final
STris base	3,038 gr	0,25 M
Glicina	15,01 gr	2 M
SDS	1 gr	1 %

FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ANEXO X : Interior de una cámara de electroforesis vertical en operación a) Durante la colocación de la muestra en el pocillo del gel, b) Después de aplicar un voltaje determinado produce un empaque uniforme de proteínas, c, d y e) las proteínas migran hacia el ánodo y se distribuyen en el gel de manera de bandas.



FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ANEXO XIII : Esquema para el protocolo del análisis de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

ESQUEMA N 1

RESULTADOS EXPERIMENTO N _____

FECHA _____

OBJETIVO DEL EXPERIMENTO: _____

CONCENTRACIÓN DEL GEL:

CARRIL 1: _____

CARRIL 2: _____

CARRIL 3: _____

CARRIL 4: _____

CARRIL 5: _____

CARRIL 6: _____

CARRIL 7: _____

CARRIL 8: _____

CARRIL 9: _____

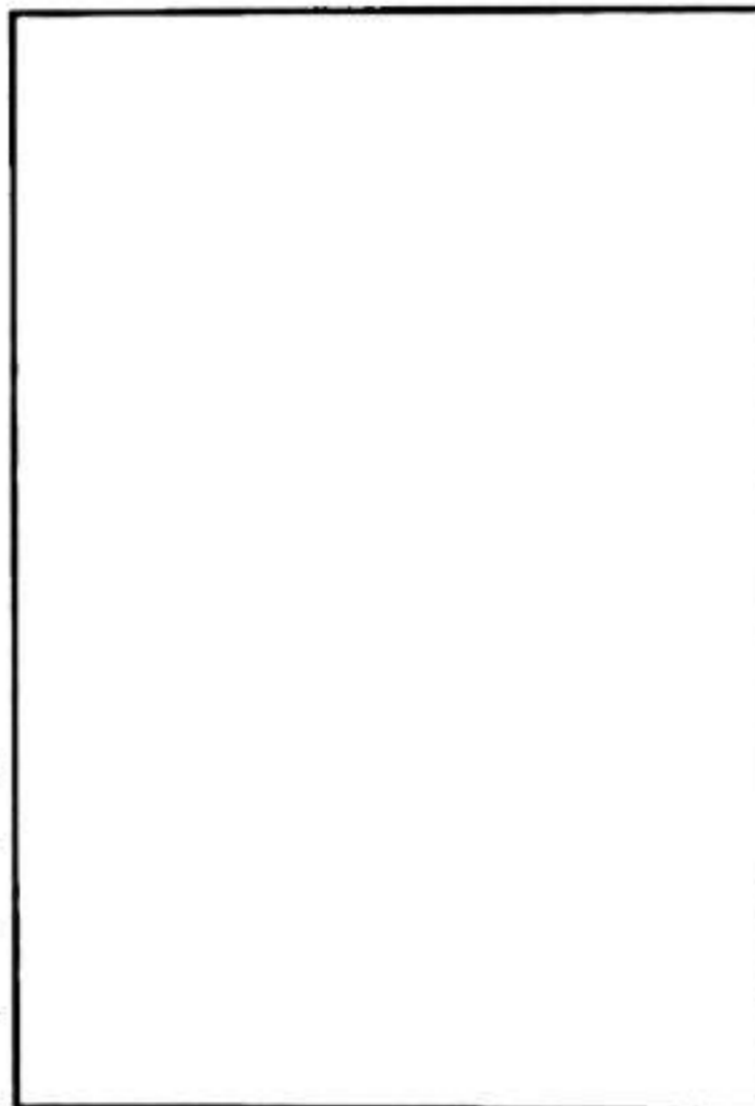
CARRIL 10: _____

CARRIL 11: _____

CARRIL 12: _____

CARRIL 13: _____

CARRIL 14: _____



OBSERVACIONES: _____

FUENTE: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ANEXO XIV : Centrífuga digital refrigerada hettich.



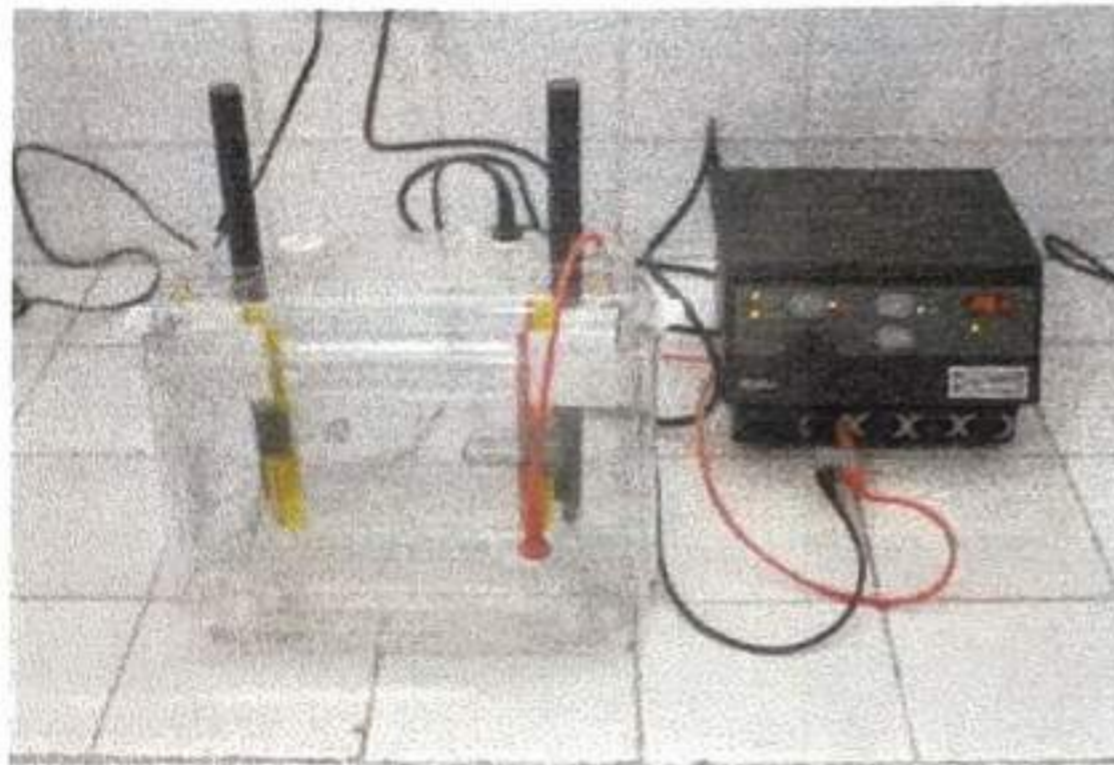
FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO XV : Proceso de diálisis de proteínas por agitación magnética.



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO XVI : Equipo para electroforesis vertical de proteínas PAGE-SDS.



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO XVII : Equipo para cromatografía.



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO XVIII : Espectrofotómetro UV-Visible marca UNICO.



FUENTE: ELABORACIÓN PROPIA

ANEXO XIX : Certificado de Análisis de albúmina sérica Sigma Aldrich.



ALBUMIN, BOVINE

Product Information

CAS NUMBER: 9048-46-8

SYNONYMS: Bovine Serum Albumin; Bovine Plasma Albumin; BSA

STRUCTURE:

The molecular weight of BSA has frequently been cited as 66,120¹ or 66,267², but it was revised in 1990 to 66,430³. All three values are based on amino acid sequence information available at the time of publication.

BSA is a single polypeptide chain consisting of about 583 amino acid residues and no carbohydrates. At pH 5-7 it contains 17 intrachain disulfide bridges and 1 sulfhydryl group.^{1,3}

PHYSICAL PROPERTIES:

Appearance:	Powder - White to light tan ⁴ ;
Solutions:	Clear to slightly hazy and amber ⁴
pI in Water at 25°C:	Endogenous Material ^{6, A7} - 4.7; 4.9;
Fatty Acid Depleted ⁸ :	5.3
pH of 1% Solution: ^{1,4}	5.2-7;
Optical Rotation: ^{1,9} [α] ₂₅₉ :	-61°; [α] ₂₆₄ : -63°
Stokes Radius (r _s): ¹⁰	3.48 nm
Sedimentation constant: ¹ S _{20,w} X 10 ¹³	4.5 (monomer), 6.7 (dimer)
Diffusion constant: ¹ D _{20,w} X 10 ⁷	5.9
Partial specific volume: ¹ V ₂₀	0.733
Intrinsic viscosity: ¹ η	0.0413
Frictional ratio: ¹ f/f ₀	1.30
Overall dimensions: ¹ A	40 X 140
Refractive index increment ¹ (578 nm) X 10 ⁻³	1.90
Optical absorbance: ¹ A _{278nm} ^{1 gmt}	0.667
Mean residue rotation: ¹ [m] ₂₂₅	8443
Mean residue ellipticity ¹	21.1 [θ] _{229nm} ; 20.1 [θ] _{222 nm}
Estimated α-helix: ¹ %	54
Estimated β-form: ¹ %	18

STABILITY / STORAGE AS SUPPLIED:

If stored at 2-8°C, BSA powders and BSA solutions offered by Sigma are stable for a minimum of 2.5 years.⁴