

Universidad Técnica Particular de Loja
BIBLIOTECA GENERAL

Revisado el I-19-83

Valor 4.200⁰⁰

Nó Clasificación 1983 Q22 IA 12-1



636
Plumas-Hidrolizados.
Nectarin animal.
Proteínas en la nutrición animal.

636.0852

636

636.0852



UNIVERSIDAD TECNICA PARTICULAR DE LOJA
FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

**HIDROLIZADO
DE PLUMAS Y
MATERIAL CORNEO**

Investigación Experimental

TESIS PREVIA A LA OBTENCION
DEL TITULO DE INGENIEROS
EN INDUSTRIAS AGROPECUARIAS

Autores:

HUGO CORONEL PUCHAICELA

MEDARDO VANEGAS VILLA

Director:

Dr. RODRIGO FAREZ O.

Loja - Ecuador



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

Dr. Rodrigo Fárez.

CATEDRÁTICO DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA,

C E R T I F I C A :

Que el presente trabajo de carácter investigativo, fué elaborado en su totalidad por los señores HUGO CORONEL PUCHAICELA y MEDARDO VANEGAS VILLA, el mismo que luego de ser revisado prolijamente merece su aprobación.



Dr. RODRIGO FAREZ
Director de Tesis

Loja, Abril/1982

C O N T E N I D O

INTRODUCCION.

CAPITULO I. CONSTITUCION DE LAS PLUMAS Y MATERIAL CORNEO

1.1. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS PLUMAS.

1.1.1. Humedad.

1.1.2. Cenizas.

1.1.3. Proteínas.

1.1.4. Azufre.

1.2. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL MATERIAL CORNEO.

1.2.1. PICO Y UNAS.

1.2.1.1. Humedad.

1.2.1.2. Cenizas.

1.2.1.3. Proteínas.

1.2.1.4. Azufre.

1.2.2. EPIDERMIS (PIEL DE LOS TARSOS).

1.2.2.1. Humedad.

1.2.2.2. Cenizas.

1.2.2.3. Proteínas.

1.2.2.4. Azufre.

CAPITULO II. HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS.

2.1. TECNICAS DE HIDROLIZADO DE PLUMAS.

2.1.1. Hidrólisis ácida.

2.1.1.1. Hidrólisis con ácidos orgánicos.

2.1.1.2. Hidrólisis con ácidos inorgánicos.

2.1.2. Hidrólisis alcalina.

2.2. TECNICAS DE HIDROLIZADO DEL MATERIAL CORNEO

2.2.1. PICO Y UNAS.

2.2.1.1. Hidrólisis ácida.

2.2.1.1.1. Hidrólisis con ácidos orgánicos.

2.2.1.1.2. Hidrólisis con ácidos inorgánicos

2.2.1.2. Hidrólisis alcalina.

2.2.2. EPIDERMIS (PIEL DE LOS TARSOS).

2.2.2.1. Hidrólisis ácida.

2.2.2.1.1. Hidrólisis con ácidos orgánicos.

2.2.2.1.2. Hidrólisis con ácidos inorgánicos

2.2.2.2. Hidrólisis alcalina.

2.3. SISTEMAS DE CONTROL DE LA HIDROLISIS.

2.3.1. Revisión de técnicas apropiadas.

2.3.1.1. Volumétrica.

2.3.1.2. Otras técnicas.

2.3.2. Técnicas aconsejadas.

CAPITULO III. TECNICAS DE SEPARACION Y PURIFICACION

3.1. TECNICAS DE SEPARACION

3.2. TECNICAS DE PURIFICACION.

CAPITULO IV. RECOMENDACIONES EN EL USO.

4.1. FORMULACION DE RACIONES.

4.1.1. Para ganadería mayor.

4.1.2. Para ganadería menor.

4.2. USO COMO COMPLEMENTO

4.3. USO COMO SUPLEMENTO.

TABLAS.

ANEXOS.

BIBLIOGRAFIA.

INDICE DE GRAFICOS

INDICE GENERAL.



OBJETIVOS.

La presente obra de carácter investigativo, pretende alcanzar:

1. La obtención de harina como etapa primaria e investigar el comportamiento físico químico de los subproductos avícolas.
2. Obtención de sustancias hidrolizadas que sean de menos complejidad y por lo tanto más digeribles para la alimentación de los animales.
3. Posibilidad de separar las sustancias no protéicas con el fin de obtener concentrados de aminoácidos que puedan utilizarse como complemento o suplemento alimenticio.
4. Utilizar materias primas no comunes que en el futuro industrial puedan suplir las necesidades de ingredientes alimenticios.

I N T R O D U C C I O N *****

Las proteínas tienen un significado particular en Biología desde el momento en que constituyen uno de los componentes indispensables de la materia viviente. Es necesario recordar que los organismos vivientes también contienen hidratos de carbono y lípidos, frecuentemente en mayor cantidad que proteínas. Por ejemplo, las plantas verdes, que son bastante pobres en proteínas, son ricas en celulosa, que es un hidrato de carbono. Sin embargo, hay diferencias esenciales entre las proteínas y la mayoría de los otros componentes celulares.

Las proteínas, como su nombre lo indica (del griego - PROTOS, lo primero), han sido consideradas durante muchos años como el componente primario de la materia viviente. Hasta mucho más tarde no se reconoció la gran importancia de los ácidos nucleicos y han constituido materia de discusión a lo largo de la última década.

Dentro de la alimentación humana y animal, las proteínas son consideradas como base primordial por los requerimientos de los organismos para con estos polímeros. En lo que respecta a la alimentación animal en particular, la formulación de raciones gira alrededor de costos que los dan justamente las proteínas; por esta razón se han realizado estudios científicos con el fin de investigar las necesidades protéicas de los animales según la función que desempeñen.

Las fuentes de proteína son la totalidad de las materias orgánicas y algunas inorgánicas. Las cantidades varían

de una substancia a otra especialmente respecto a los organismos vegetales que contienen cuantitativamente menores cantidades que los organismos animales.

Una de las fuentes de importancia por el contenido de materia protéica es justamente la de origen avícola. Las plumas, picos, uñas y piel de los tarsos se consideran como subproductos del faenado de broilers y se constituyen en ricas fuentes de proteína. Estas materias muchas de las veces son desechadas y en otras oportunidades, especialmente en nuestro medio se depositan en los campos para darle utilidad como fertilizantes. Más práctico resultaría que las empresas industriales del faenado de broilers, que obtienen grandes cantidades de estos subproductos, sometan a procesos de adaptación para múltiples usos en los cuales se aprovecharía mejor su contenido no solamente de proteínas sino también su poder energético, minerales y algunas vitaminas. Una de las utilidades que se pueden dar es precisamente en la alimentación del ganado y aves, considerándolo como complemento o suplemento en la formulación de raciones alimenticias.

La presente obra de carácter investigativo va encaminada a averiguar las características físicas y químicas de estos subproductos; luego conociendo el alto contenido de proteínas, determinar el grado en que pueden hidrolizarse en medios ácidos y alcalino y conocer el grado de solubilidad y degradación para poder recomendar el uso en fines alimenticios. La degradación hidrolítica está controlada volumétricamente, valorando muestras con ácido y base respectivamente. Posteriormente se investigan los métodos y técnicas de separación y purificación de las materias con alto contenido en-

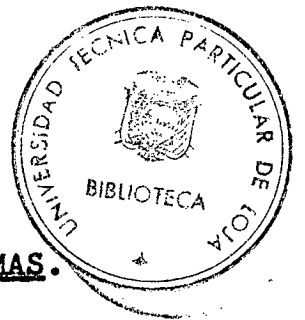
636.5084

proteínas, aplicables al laboratorio químico, en afán de con
seguir sustancias purificadas que servirían como suplemen -
tos en la alimentación animal.

Finalmente la presente obra recomienda el uso de los-
subproductos de origen avícola para la formulación de racio-
nes alimenticias, tomando como base el alto contenido de pro
teínas y su eficiente poder energético.

CAPITULO I

CONSTITUCION DE LAS PLUMAS Y MATERIAL CORNEO



1.1. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS PLUMAS.

Son formaciones de células muertas muy queratinizadas y mineralizadas. En las aves adultas se diferencian las plumas, el plumón y las filiplumas.

Cada pluma consta de un eje en el que se distingue una parte inferior hundida en un folículo, llamado cañón o cálam y una parte superior o raquis (figura 1.1).

En el interior del raquis se encuentra un tejido queratinizado o médula, a cada lado del raquis hay una serie de barbas paralelas cuyo conjunto constituye el vexillum o estandarte. Cada barba a su vez está provista de numerosas barbillas, que se relacionan entre si por delgadas barbicelas en forma de gancho.

En el punto de unión del raquis con el cálam, existe un ombligo superior y a sus lados se localiza un segundo estandarte en forma de plumón o hiporaquis.

Las plumas se insertan en el cuerpo, según áreas determinadas (pterilas) separadas por otras zonas desprovistas de plumas (apterias).

Las plumas se llaman tectrices cuando cubren el cuerpo, remiges cuando se insertan en las alas y rectrices o timoneras cuando forman la cola.

El plumón está formado por un cálam o un raquis, reducidos, y por unas partes largas y flexibles desprovistas de barbas pero si posee barbillas cortas; lo tienen los polluelos al nacer y algunos adultos debajo de las plumas (fig 1.2)

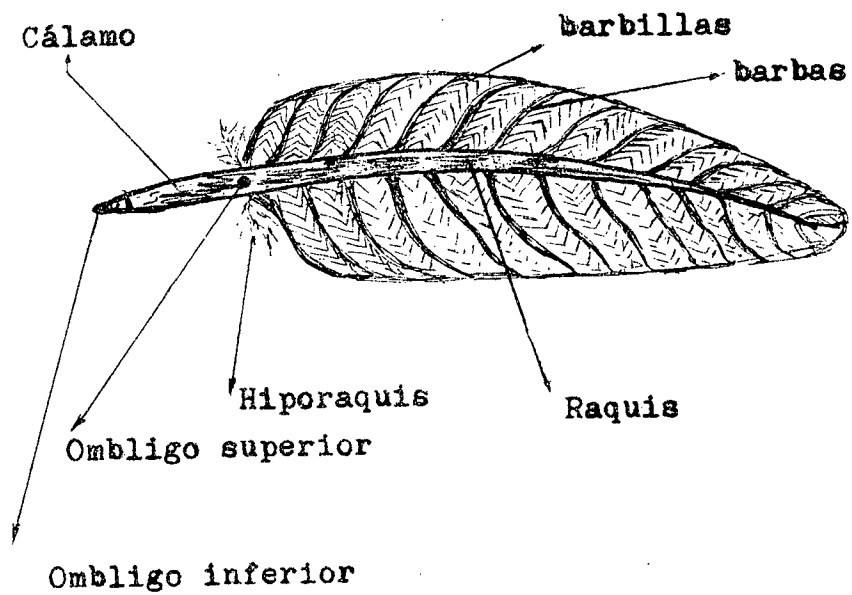


Fig. 1.1. Partes de una pluma



Fig. 1.2. Plumón visto a gran aumento.



Fig. 1.3. Filiplumas vistas a gran aumento.

Las filiplumas presentan un largo raquis con algunas barbas y barbillas en su extremo (fig. 1.3). Crecen en grupos y están distribuidas por toda la superficie del cuerpo.

El color de las plumas varía mucho de una especie a otra. Todo pájaro tiene a lo largo de su vida, tres tipos de plumaje: PLUMON, PLUMAJE JUVENIL y PLUMAJE ADULTO.

El plumaje adulto suele ostentar, en algunas especies una diferenciación de carácter sexual. Es el plumaje denominado nupcial.¹⁰

1.1.1. HUMEDAD. La determinación de humedad en una muestra nos da a apreciar el valor cuantitativo de agua y materia seca. Para aplicar el proceso (anexo 1), las plumas se debieron convertir en harina, y de esta forma adquirir un valor más exacto y en menor tiempo.

Una vez recogidas las plumas, inmediatamente después de la faena de pelado (proceso mecánico, en el camal avícola El Valle) se las lavó y dejó bajo la acción de los rayos solares para eliminar el exceso de agua; posteriormente se las sometió a la molturación.

La harina de plumas es de un color blanco tendiente al crema (depende de la raza del broiler), muy liviana y voluminosa; los raquis dan una harina distinta a la que producen las barbillas que más bien se agrupan formando grumos semejantes a algodón y con un olor característico.

El valor obtenido es el de 8,82 % de humedad y un contenido de materia seca del 91,18 %.

1.1.2. CENIZAS. El cálculo de cenizas (anexo 2) es otro de los análisis que nos sirven para averiguar los caracteres de una sustancia. Utilizando muestra molturada y carente de grasa (anexo 5), después de aplicar el proceso se obtuvo que la harina de plumas posee el 2,96 % de cenizas, lo que nos da a entender que esta sustancia contiene componentes químicos como: óxidos, carbonatos, fosfatos y sulfatos minerales.

1.1.3. PROTEINAS. La determinación de proteínas, a base del cálculo de nitrógeno total, es el análisis de mayor importancia de acuerdo a los fines investigativos de la presente obra. Trabajando con muestra molturada y desengrasada y aplicando la técnica Kjeldahl se obtuvo el 80,69 % que se considera un valor considerable de proteína bruta.

Ya en el proceso mismo de determinación de Nitrógeno total, al apreciar los continuos virajes del indicador en la recepción del destilado hace suponer la alta cantidad de nitrógeno y proteínas.

Según fuentes de información las plumas después de un proceso de hidrolizado contienen alrededor del 75 % de proteína digerible; esto hace suponer que es una fuente rica y aprovechable en la alimentación animal.

1.1.4. AZUFRE. El azufre en la harina de plumas se encuentra formando los aminoácidos sulfurados como son la metionina y la cisteína y se determina precipitándolo con el acetato de plomo en forma de sulfuro de plomo (anexo 4).

Si el contenido de proteína es alto también posee la harina de plumas alto contenido de aminoácidos sulfurados y

desde este punto de vista el valor obtenido que corresponde - al de 0,46 %, se considera razonable y da lugar a suponer que la harina de plumas puede servir como una fuente de estos aminoácidos y que podrían aportarse a los animales en las raciones.

El azufre es un mineral necesario para la síntesis de los aminoácidos que lo contienen.⁴

El azufre es un mineral necesario especialmente en el ganado rumiante y tiene que ver con la formación de la piel y la lana.

1.2. CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DEL MATERIAL CORNEO.

Se considera como material córneo en las aves al picos, las uñas, que son formaciones queratinizadas con características propias en la especie avícola; y la epidermis o piel de los tarsos que son más bien escamas y sus características son diferentes a las plumas, picos y uñas.

1.2.1. PICO Y UNAS. La piel, alrededor de cada mandíbula, se endurece mucho y forma una especie de estuche córneo o ranfoteca.

Las puntas y los bordes del pico son las partes más duras. Los orificios nasales se abren en la parte anterior de la ranfoteca. En las aves en general la forma del pico varía de acuerdo al régimen alimenticio.¹⁰

Las uñas o garras son consideradas como escamas especializadas, la mayoría de las aves las tienen encurvadas en forma de gancho. En su parte dorsal son más gruesas. En los machos se localiza el tarso-metatarso, una garra córnea que -

también se denomina espolón.¹⁰

Después de la faena de pelado de los broilers (mecanizado), las uñas quedan impregnadas a la piel de los tarsos; los picos deberán desprenderse de las cabezas con instrumentos cortantes, lo que permite que contenga cierta cantidad de hueso y material cárnico.

1.2.1.1. HUMEDAD. En los dos casos, picos y uñas respectivamente, se debió transformar en harinas; de ahí que la humedad la denominaremos de harina de picos y de uñas.

Las uñas únicamente necesitan desprenderse de la piel de los tarsos; pero los picos para prepararlos para los análisis, inclusive antes del proceso de molturación deben someterse a un ligero calentamiento en agua para eliminar los restos cárnicos que se hallan adheridos y que alterarían los valores cuantitativos de los respectivos análisis; pero se debe considerar que estos subproductos, caso de usarlos en fines alimenticios no haría falta la eliminación de los restos cárnicos.

Los valores obtenidos son el 8,78 % de humedad y un contenido de materia seca del 91,22 %, esto en lo que corresponde a los picos; para las uñas corresponden los valores de 8,06 % de humedad y 91,94 % de materia seca.

1.2.1.2. CENIZAS. Los valores obtenidos de ceniza en las harinas de picos y uñas son 3,23 % y 3,96 % respectivamente, valores que indican que también estos subproductos poseen óxidos, carbonatos, fosfatos y sulfatos minera-

les. El valor de las cenizas en los picos es ligeramente más alto que las plumas y que la piel de los tarsos en razón de que los picos salen con una porción ósea dependiendo de la precisión de corte al momento que se lo desprende de la cabeza.

1.2.1.3. PROTEINAS. La harina de uñas tiene el 81,12 % de proteínas, es decir un valor tan alto como la harina de plumas; mientras que los picos poseen un valor menor (33,12 %) que se atribuye a que el pico no solo se compone de material córneo sino también de cierta cantidad de hueso que disminuye notablemente el contenido de proteínas y aumenta ligeramente el contenido de cenizas.

Si nos referimos específicamente al valor de proteína en los picos debe considerarse que el valor es bajo en relación al contenido de las plumas y uñas, pero si relacionamos este valor con sustancias orgánicas de distinto origen, resulta bastante considerable no desechándose la posibilidad de que pueda utilizarse con fines industriales.

1.2.1.4. AZUFRE. Una vez aplicado el proceso de determinación del azufre (anexo 4) se obtuvieron valores como son 0,2054 % para la harina de picos y el 0,2909 % el porcentaje para la harina de uñas.

Prácticamente todos los alimentos contienen más del 0,1 % de azufre. Sin embargo el pasto maduro y el henificado tienen poco azufre y no suministran las cantidades adecuadas para el rendimiento óptimo de los animales.⁴

Los valores obtenidos en los análisis de cantidad de-

azufre nos da a entender que las harinas en mención poseen-- mayor cantidad que muchos otros alimentos, especialmente los de origen vegetal.

1.2.2. EPIDERMIS (PIEL DE LOS TARSOS). Todas las aves poseen las patas cubiertas - de escamas, de origen epidérmico.¹⁰

La piel de los tarsos se desprende de las patas al mismo tiempo que las plumas por la acción del agua a alta temperatura. La harina de piel de los tarsos posee un color que fluctúa entre el blanco crema al amarillo, este particular depende del grado de pigmentación de las aves de acuerdo a ciertos factores como la raza y tipo de alimentación; al igual - que la harina de plumas, es liviana y voluminosa.

1.2.2.1. HUMEDAD. La cantidad de agua contenida en la harina de la piel de los tarsos es de 9,02 % e indica que el contenido de materia seca es de 90,98 %, utilizando el mismo proceso que para las otras sustancias analizadas en la presente investigación.

1.2.2.2. CENIZAS. El valor de las cenizas en la epidermis o piel de los tarsos es de 2,84 %, que es un porcentaje menor en relación con las plumas, picos y uñas; pero en igual forma nos indica su contenido de ciertos compuestos minerales.

1.2.2.3. PROTEINAS. Según la técnica Kjeldahl las proteínas en la epidermis de los tarsos está en - 52,33 %, valor inferior comparado con el de las plumas y uñas y superior al de picos. De igual forma es una cantidad alta -

en relación a otras sustancias destinadas a la alimentación.

1.2.2.4. AZUFRE. Se ha demostrado que la deficiencia de azufre no solo afecta la digestión de la celulosa y las proporciones de ácidos volátiles, sino que retrasa también la conversión de lactatos a propionatos por los microbios del rumen.³

La piel de los tarsos contiene el 0,4722 % de azufre y podría considerarse como una fuente de aminoácidos sulfurados y podría ser utilizado como suplemento alimenticio para animales, preferentemente ganado mayor; es decir es un resultado que nos puede llevar a conclusiones de mucho provecho - especialmente en la industria de la formulación y preparación de raciones.

CAPITULO II

HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS

Antes de entrar al estudio del proceso de la hidrólisis, haremos un enfoque acerca de las proteínas.

Los albuminoides, proteínas o prótidos, son sustancias naturales nitrogenadas formadas por condensación de un número grande de moléculas de los llamados aminoácidos.

Las proteínas forman, después del agua, la parte más importante de los tejidos y humores animales y figuran en el organismo humano en la proporción de alrededor del 16 %. También aunque en menor proporción se encuentran en los tejidos vegetales. La importancia que siempre se le asigna en la constitución del protoplasma celular, motivó el nombre de proteínas o prótidos, del griego "Proteios" que significa lo primero o lo fundamental.

De la misma definición que hemos dado se deduce que los prótidos deben contener C, H, O y N; muchas proteínas poseen además azufre; en las llamadas nucleoproteínas se encuentra el fósforo; y en otras muy pequeñas cantidades de yodo, bromo, hierro, manganeso, magnesio, etc.₂

Proteína, que significa como ya se dijo de "primera importancia" es la palabra apropiada para designar a este polímero complejo de aminoácidos, que se encuentra en todas las células, está implicado en la mayoría de las reacciones químicas vitales en el metabolismo de las plantas y los animales.

Las proteínas forman una importante estructura de los tejidos blandos del organismo de los animales, tales como los músculos, tejido conjuntivo, colágeno, piel, pelo, pezuñas, y en las gallinas, plumas, uñas y parte córnea del pico.

Las proteínas de la sangre, albúminas y globulinas, ayudan a mantener la homeostasis, a regular la presión osmótica, actuando como un suministro de "reserva" de aminoácidos - además de tener otras muchas funciones. En la coagulación de la sangre están implicados el fibrinógeno, tromboplastina y otras varias proteínas. También se encuentra en la sangre la proteína conjugada hemoglobina, que lleva oxígeno en las células, y las lipoproteínas, que transportan las vitaminas solubles en grasa y otros metabolitos grasos. 11

"Aunque todas las proteínas en un animal o en los piensos se refieren colectivamente como "Proteína", cada proteína "per se" difiere de todas las demás.

Es la sucesión específica de aminoácidos y la manera en la cual las cadenas de aminoácidos están conectadas unas con otras, lo que determinan las propiedades individuales físico-químicas de cada proteína y, por ello, su función biológica" 1

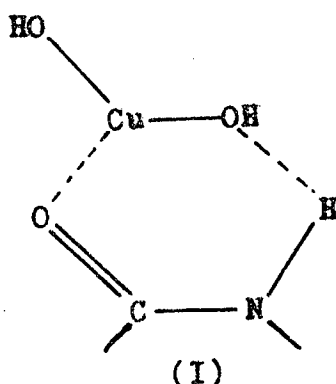
Sabemos que las proteínas abastecen al organismo un complejo de aminoácidos específicos; cuando se incluye las proteínas en una ración alimenticia, lo que hacemos es aportar determinados aminoácidos y como las proteínas completas son pocas, y las pocas que hay son muy caras.

El valor biológico de una proteína se expresa con un número que indica la relación entre el N que detiene el organismo y el N absorbido con el alimento, en otras palabras nos indica el rendimiento o utilización drástica de una proteína. Ejemplo, cuando decimos que el valor biológico de la leche es 88 para el crecimiento, significa que el 88% de las proteínas digeribles de la leche, el organismo las emplea para las sín-

1. La Hacienda, # 3, Mayo/Junio, 1981, pág. 40.

tesis celulares y el consecuente crecimiento.¹⁷

Cuando se trata de investigar la existencia de proteínas, se realizan experiencias, como por ejemplo la reacción del biuret, que se efectúa añadiendo disolución diluida de sulfato de cobre a una disolución fuertemente alcalina de proteína, produce un color violeta purpúreo. Como todos los polipéptidos dan la misma reacción, se considera que es debida a los enlaces péptidos, $-\text{CONH}-$, en la molécula de proteína, se supone se forma un complejo en el que el ión cobre se coordina con el enlace péptido para formar un anillo que contiene cobre y el cual tiene probablemente la estructura (I), u otra similar correspondiendo a un compuesto de coordinación.



A bajos valores de pH el ión cúprico se coordina también con los grupos carboxilo y a valores de pH más altos con los grupos amínicos de las proteínas. Se usa frecuentemente la reacción del biuret para la determinación cuantitativa de las proteínas en el suero sanguíneo. Sin embargo no es muy sensible, con lo que una reacción negativa no indica la ausencia de proteínas.

Las proteínas son precipitadas por medio de las sales de los metales pesados (Cu, Pb, Hg, Fe), por una serie de ácidos orgánicos incluyendo el ácido tricloracético, el ácido salicilsulfónico y el ácido pícrico, y también por ácidos co-

loidales (por ejemplo el ácido wolfrámico, ácido tánico) y bases (hidróxido férrico). Estos precipitantes no pueden ser usados en general para la preparación y precipitación de proteínas puras, porque muchas proteínas se desnaturalizan por acción suya. Sin embargo se han preparado proteínas nativas también a partir de sus compuestos por acción de cinc, dado que el cinc, en forma de sales, se añade a las disoluciones de proteínas cuidadosamente y evitando un exceso. Si se usa exceso de reactivos precipitantes, la mayoría de las proteínas se precipitan cuantitativamente. Este método tiene mucha utilización en los laboratorios clínicos durante la desproteinización de los líquidos biológicos. En la determinación cuantitativa de proteínas en el suero sanguíneo y en fluidos similares y en las pruebas cualitativas para poner de manifiesto la presencia de proteína en la orina y en otros líquidos biológicos.⁶

Aún cuando es muy difícil separar la proteína desnaturalizada precipitada de los agentes precipitantes antes mencionados, la proteína puede ser obtenida fácilmente en un estado desnaturalizado por coagulación, por el calor o mediante el método Sevag, en el cual la proteína es desnaturalizada e insolubilizada por agitación con cloroformo y con alcohol amílico u octanol.⁶

En la determinación cuantitativa de las proteínas, el precipitado obtenido por los reactivos referidos anteriormente, puede ser usado para la determinación cuantitativa por el análisis Kjeldahl (anexo 3). Al aceptar este procedimiento, se asume que el precipitado contendrá solamente nitrógeno proteínico. Esta suposición no está del todo justificada porque

se precipitan al mismo tiempo que las proteínas ácidos polissacáridos y ciertos lípidos, ambos de gran tamaño molecular.⁶

El análisis de la constitución de las proteínas, se ha hecho mediante la hidrólisis, o sea la fijación de agua que conduce a la paulatina simplificación de la primitiva molécula, o degradación.

La degradación hidrolítica de las proteínas se hace por fases sucesivas, conociéndose el final de la operación cuando resulta negativa la reacción de biuret. Las diversas etapas de la degradación son las siguientes:

PROTEINAS → ALBUMOSAS → PEPTONAS → POLIPEPTIDOS → AMINOACIDOS

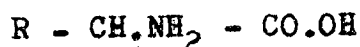
Esta operación puede realizarse tratando las proteínas con ácidos (ClH , F_2H_2 , SO_4H_2) o con álcalis en medios acuosos y en caliente o bien trabajando a la temperatura ordinaria por la acción de diversas diastasas proteolíticas como la tripsina.²

"Una hidrólisis similar producen las diastasas proteolíticas segregadas por el estómago, el páncreas y el tubo intestinal sobre las proteínas de los alimentos y que permiten digerir y aprovechar aún los albuminoides coagulados e insolubles, solubilizándolos (queso, huevos duros, pan, carne cocida) Las bacterias de la putrefacción también hidrolizan las proteínas"²

Los productos de la hidrólisis de las proteínas son finalmente los aminoácidos. Como su nombre lo indica, los aminoácidos son sustancias que contienen en sus moléculas por lo menos un grupo de la función amina y otro de la función ácida. Cuando las dos funciones son vecinas entre sí se deno-

2. Cassi Iacobucci, "QUIMICA ELEMENTAL MODERNA ORGANICA", p.294

minan alfa-aminoácidos. La fórmula general de los aminoácidos es la siguiente:



Los ácidos, las bases y los enzimas, son los agentes utilizados para la disociación hidrolítica de las proteínas. - en la mayoría de los casos se ha utilizado el ácido clorhídrico a la temperatura de ebullición a fin de producir la degradación. El ácido clorhídrico de punto de ebullición constante contiene solamente un 20,5 % de HCl; para estos fines se diluye, antes de usarlo, el ácido clorhídrico comercial, el cual contiene un 35 % de HCl. La proteína seca se mezcla con unos diez volúmenes de ácido al 20,5 % y se somete a ebullición sobre un baño maría durante unos 30 - 60 minutos, de esta forma se evita la formación de espuma durante el proceso de hidrólisis. Se logra entonces una hidrólisis total sometiendo a reflujo la proteína durante unas 12 - 70 horas con el ácido clorhídrico hirviendo.

"El ácido clorhídrico utilizado para practicar el proceso de hidrólisis no debe contener trazas de hierro puesto que el cloruro férrico cataliza la destrucción por oxidación de algunos de los aminoácidos. Este fenómeno se puede evitar en cierta forma, utilizando para las operaciones encaminadas a la hidrólisis una mezcla de ácido clorhídrico y ácido fórmico."³

Los mejores resultados se obtienen cuando se someten al vacío tubos que contienen la proteína y ácido clorhídrico destilado en recipiente de vidrio, se cierran los tubos y se calientan luego hasta que se completa la hidrólisis.

En todos estos procesos el ácido clorhídrico se elimina destilando al vacío y recogiendo el ácido sobre hidróxido-
3. Felix Haurowitz, "QUIMICA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS", p.26.

sódico.

Si se hubiese usado ácido fórmico, este ácido se elimina al mismo tiempo durante el proceso de eliminación del ácido clorhídrico. El residuo contiene los aminoácidos como hidroclocloruros. Se pueden convertir en aminoácidos libres pasándolos a través de una columna de intercambio conteniendo una resina de intercambio aniónico. Cuando se pretende obtener aminoácidos libres, podría resultar ventajoso realizar la hidrólisis con ácido sulfúrico 8 N, el cual puede eliminarse por completo cuantitativamente, del hidrolizado por la adición de la cantidad equivalente de hidróxido bórico, pueden ser entonces sometidos a extracción con agua hirviente a fin de eliminar las considerables cantidades de aminoácidos que se absorben. Los filtrados y las aguas de lavado se unen, con lo que se llega a obtener una mezcla de aminoácidos.⁶

La ventaja de una hidrólisis mediante ácidos estriba en que se evita la racemización, con lo que los aminoácidos se obtienen como L-aminoácidos sin cambiar. La mayoría de los aminoácidos resisten a la acción de los ácidos minerales a la temperatura de ebullición. El triptófano, que se destruye por la acción de los ácidos hirvientes se puede aislar de los hidrolizados obtenidos mediante acción enzimática. Los productos de descomposición del triptófano se convierten en una sustancia oscura denominada humina, que se forma probablemente por condensación de los núcleos de indol del triptófano con pequeñas cantidades de aldehídos, producidos estos durante el proceso de hidrólisis. Durante la hidrólisis ácida se oxidan considerables cantidades de aminoácidos sulfurados, dando lugar a diversos productos y una pequeña porción -

de los hidroxiaminoácidos, serina y treonina, sufren oxidación para formar los correspondientes alfa-cetoácidos. La asparraguina y la glutamina se hidrolizan mediante el ácido clorhídrico hirviente, produciendo ácido aspártico y ácido glutámico. El amonio que se libera se encuentra luego en los hidrolizados en la forma de cloruro amónico.⁶

El mejor método de determinar los aminoácidos sulfurados cistina y cisteína es mediante oxidación de la proteína por tratamiento con ácido perfórmico frío (preparado con ácido fórmico y agua oxigenada) e hidrólisis subsiguiente con ácido clorhídrico. La cistina y la cisteína se convierten en ácido cisteico, $\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, que resiste a la acción del ácido clorhídrico hirviente, y puede ser determinado, por tanto, en el hidrolizado. La oxidación de los hidroxiaminoácidos es muy lenta durante la hidrólisis efectuada por intermedio del ácido clorhídrico. El contenido verdadero de estos aminoácidos, sensibles a la acción de los ácidos, se puede determinar en la proteína hidrolizándola en diferentes muestras de proteína durante diversos períodos de tiempo; se mide entonces en cada uno de los hidrolizados la cantidad de serina y treonina y se calcula la cantidad inicial de estos aminoácidos por extrapolación a tiempo cero.

Se puede conseguir una descomposición hidrolítica completa hirviendo las proteínas con hidróxido bórico 4 N o con hidróxidos alcalinos. Se concede preferencia al hidróxido bórico ya que su exceso se puede eliminar por medio de una cantidad equivalente de ácido sulfúrico. Los hidrolizados alcalinos son incoloros y no contienen humina. La hidrólisis mediante álcalis tiene desventajas: los aminoácidos sufren race

mización, algunos de ellos se desaminan, la arginina se convierte en ortinina y en úrea y la cistina y la cisteína se destruyen.

Se puede lograr también una hidrólisis completa por acción de enzimas proteolíticos bajo condiciones muy suaves - se ha conseguido así la conversión cuantitativa de varias proteínas en aminoácidos. Los enzimas usados han sido la papaína, la leucina-aminopeptidasa y la carboxipeptidasa. Los hidrolizados enzimáticos contienen triptófano y además glutamina y asparraguina. A partir de aquí se pueden aislar amidas utilizando el hidrolizado. La hidrólisis enzimática es muy útil cuando se desean obtener productos intermedios de tipo péptido por hidrólisis parcial.

También se llega a una hidrólisis parcial utilizando ácido clorhídrico a 37° C. La presencia de péptidos específicos en tales hidrolizados indica que la susceptibilidad de diversos enlaces péptidos frente al ácido clorhídrico es diferente; por ejemplo, los enlaces péptidos formados por los radicales aspartilo o por la serina y la treonina son hidrolizados muy fácilmente. El enlace -CO.NH- formado por los grupos amínicos de los hidroxiaácidos se convierten fácilmente en la unión tipo éster -CO.O- en el cual el grupo hidroxilo de la serina o la treonina se combina con el grupo carboxílico de un aminoácido adyacente. Los enlaces tipo éster formados por este "desplazamiento acílico" son más susceptibles de ser hidrolizados que los enlaces péptidos. A diferencia de estos enlaces péptidos fácilmente hidrolizables, aquellos otros formados por la valina son particularmente estables. Se ha conseguido también una hidrólisis parcial de

las proteínas por tratamiento con ácido sulfúrico 25 N a la temperatura de 40° C o hirviendo la proteína con Dowex 50 que es una resina de intercambio iónico sulfonatada.



Cuando se calientan las proteínas con hidrazina anhidra, N_2H_4 , se disocian los enlaces péptidos por hidrazinólisis.



Akabori, Quién describió esta reacción, la utilizó para la determinación de los aminoácidos terminales que tienen un grupo CO.OH libre. A diferencia de los otros aminoácidos de la cadena péptida -- que son convertidos en sus hidrazidas, el aminoácido terminal se encuentra en los hidrolizados en forma de aminoácido libre.⁶

2.1. TECNICAS DE HIDROLIZADO DE PLUMAS. Las pruebas del proceso de hidrólisis se realizaron a nivel de laboratorio, y es así como se sometieron a ebullición muestras de harinas de plumas, picos, uñas y piel de los tarsos en medios ácidos y alcalinos y previo desengrasado.

2.1.1. HIDROLISIS ACIDA.

2.1.1.1. HIDROLISIS CON ACIDOS ORGANICOS. Entre los ácidos orgánicos el que se utilizó fué el ácido acético que al parecer presenta ventajas, por ejemplo de ser rápido, y causar poca destrucción del triptófano fenómeno que puede interpretarse por la coloración amarillenta de las distintas muestras en la experimentación hidrolítica.

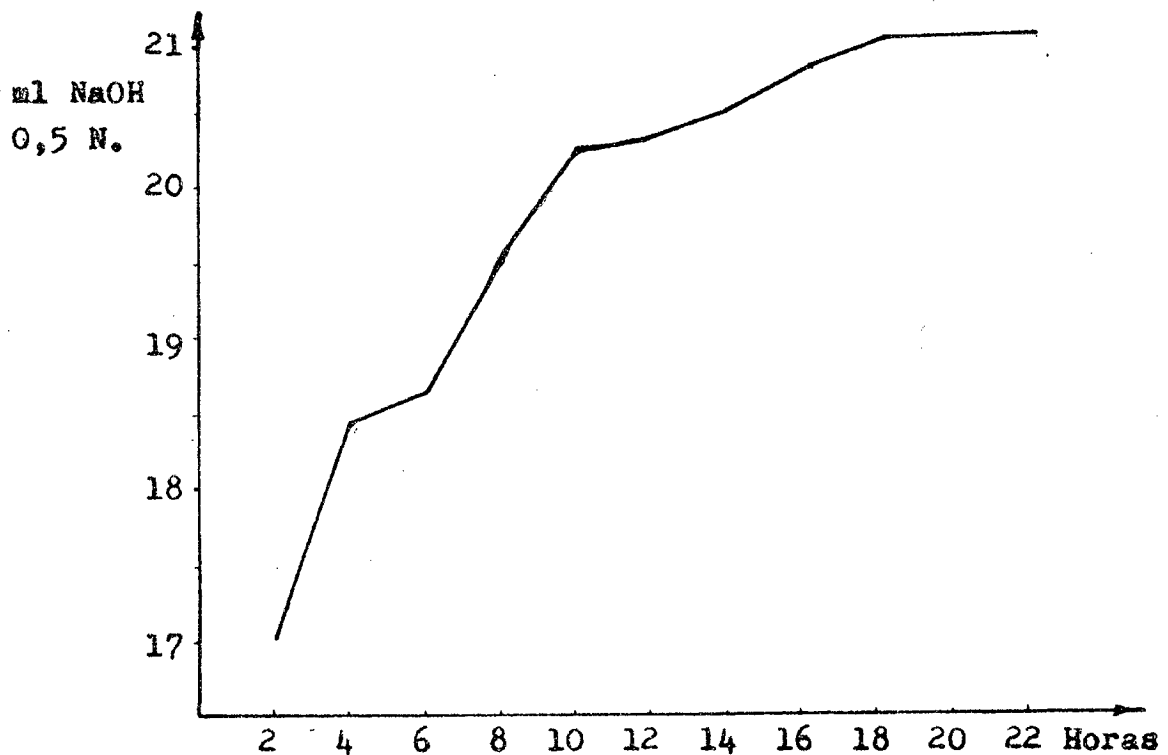
CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO ACETICO 5 N

tiempo (horas)	1ra valoración * ml de NaOH 0,5 N	2da valoración** ml de NaOH 0,5 N
2	17,0	-
4	18,4	1 gota
6	18,6	1 gota
8	19,5	1 gota
10	20,2	1 gota
12	20,3	1 gota
14	20,5	1 gota
16	20,8	1 gota
18	21,0	1 gota
20	21,0	1 gota
22	21,0	1 gota

* 2 ml de muestra cada 2 horas utilizando fenolftaleína como indicador.

** La misma muestra de la primera valoración se agrega 1 ml de formaldehído.

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA 1ra VALORACION

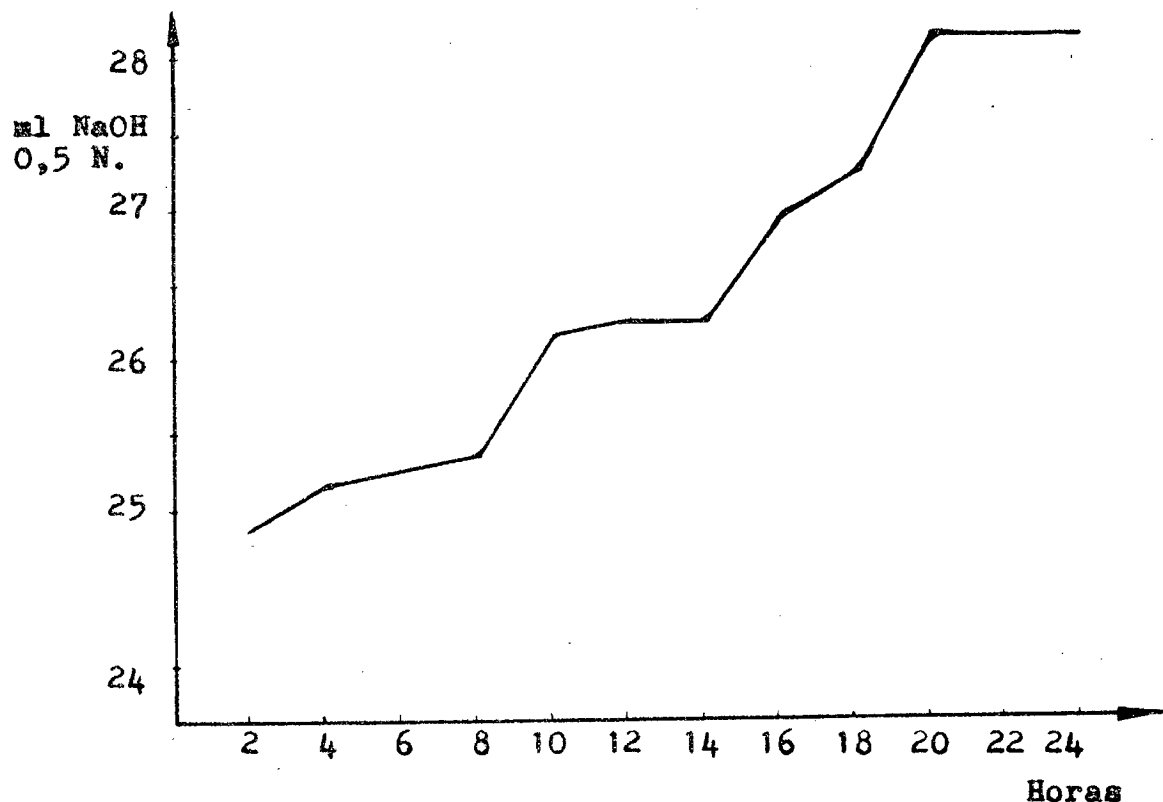


2.1.1.2. HIDROLISIS CON ACIDOS INORGANICOS. Entre los ácidos inorgánicos el que mayores ventajas presenta es el ácido clorhídrico 20,5 %.

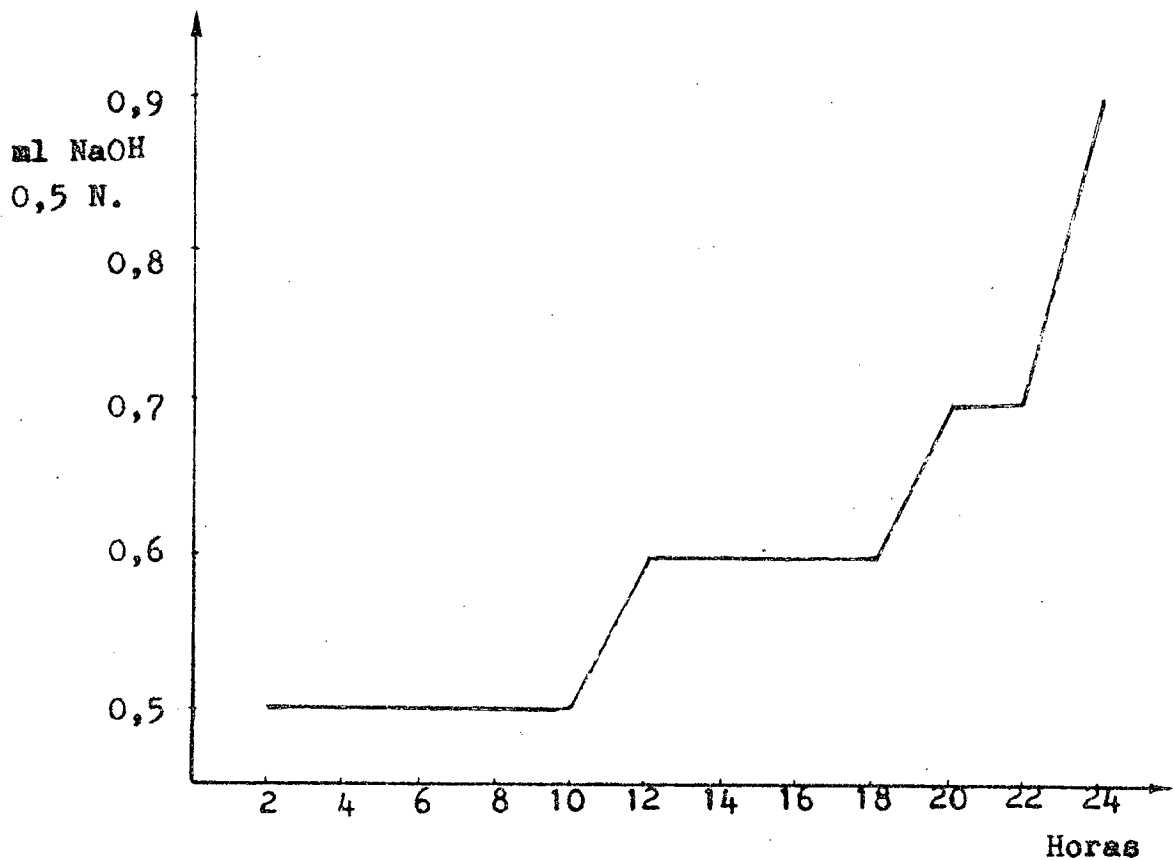
CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON HCl al 20,5 %

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da valoración ml NaOH 0,5 N
2	24,9	0,5
4	25,2	0,5
6	25,3	0,5
8	25,4	0,5
10	26,2	0,5
12	26,6	0,6
14	26,6	0,6
16	27,0	0,6
18	27,6	0,6
20	28,2	0,7
22	28,2	0,7
24	28,2	0,9

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION



CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA SEGUNDA VALORACION



La hidrólisis con ácido clorhídrico se desarrolla destruyendo la totalidad del triptófano formando huminas interpretándose este fenómeno por la coloración oscura que toman las muestras; además en el proceso se forman enlaces tampón que no permiten se siga desarrollando el proceso, pero este problema se elimina con la segunda valoración que indica un ascendente consumo de NaOH 0,5 N. En esta última etapa, el formaldehído desempeña la función de destrucción de dichos enlaces.

2.1.2. HIDROLISIS ALCALINA. La hidrólisis alcalina, se la realizó hirviéndolas a las muestras en una solución de NaOH 2 N. Los agitadores evitan la formación de espuma. La desventaja de este tipo de hidrólisis es que el control del proceso no puede desarrollarse vo-

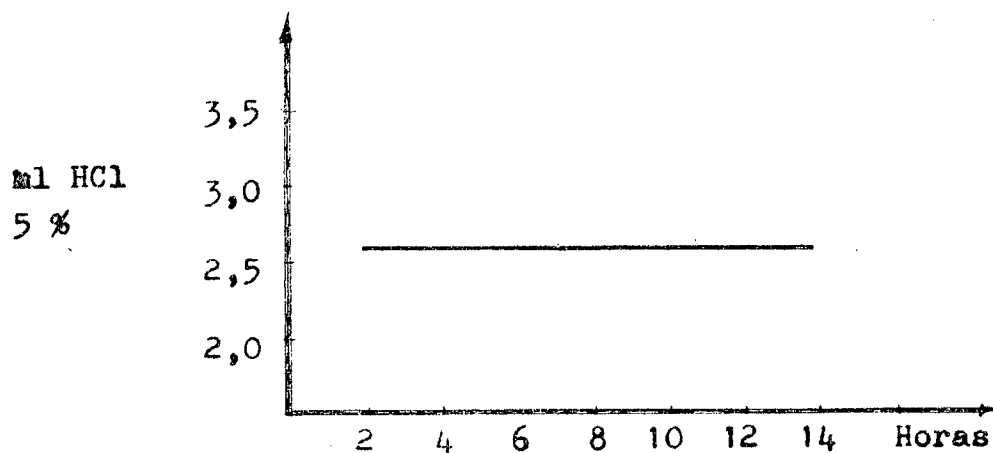
lumétricamente; este particular puede apreciarse por el constante consumo de ácido clorhídrico al 5 %.

CONSUMO DE HCl AL 5 % EN LA HIDROLISIS CON NaOH 2 N.*

Tiempo (horas)	ml HCl 5 %
2	2,6
4	2,6
6	2,6
8	2,6
10	2,6
12	2,6
14	2,6

* El consumo de HCl se expresa sobre valoraciones en 2 ml de muestra cada dos horas; la fenolftaleína se utilizó como indicador de los virajes.

CURVA DE CONSUMO DE ACIDO CLORHIDRICO 5 % EN LA HIDROLISIS -
CON HIDROXIDO DE SODIO 2 N.



2.2. TECNICAS DE HIDROLIZADO DEL MATERIAL CORNEO.

Para las experiencias del proceso de hidrólisis se utilizan las mismas soluciones que para el caso anterior (harina de plumas). El material córneo se comporta con caracteres similares, es decir: el tiempo y las reacciones.

2.2.1. PICO Y UNAS.

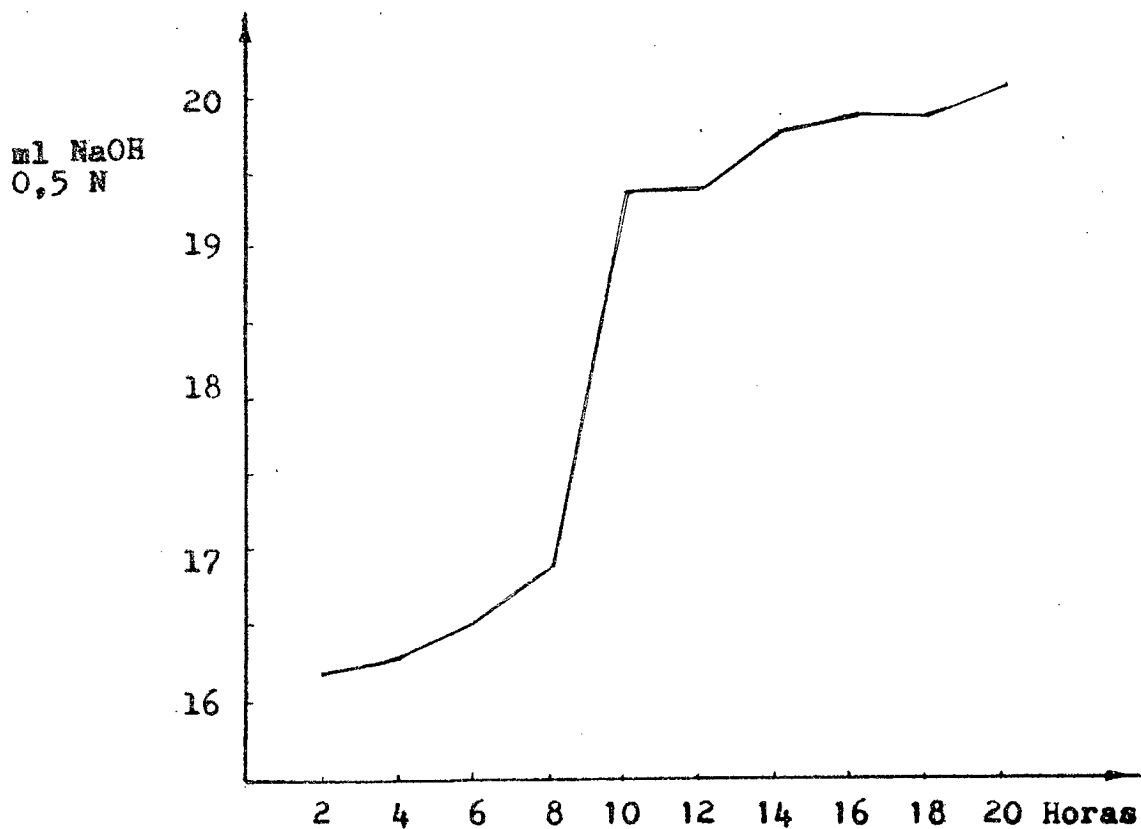
2.2.1.1. HIDROLISIS ACIDA.

2.2.1.1.1. HIDROLISIS CON ACIDOS ORGANICOS.

CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO ACETICO 5 N
(muestra de harina de picos)

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da Valoración ml NaOH 0,5 N
2	16,2	1 gota
4	16,3	1 gota
6	16,6	1 gota
8	16,9	1 gota
10	19,4	1 gota
12	19,4	1 gota
14	19,8	1 gota
16	19,9	1 gota
18	19,9	1 gota
20	20,1	1 gota

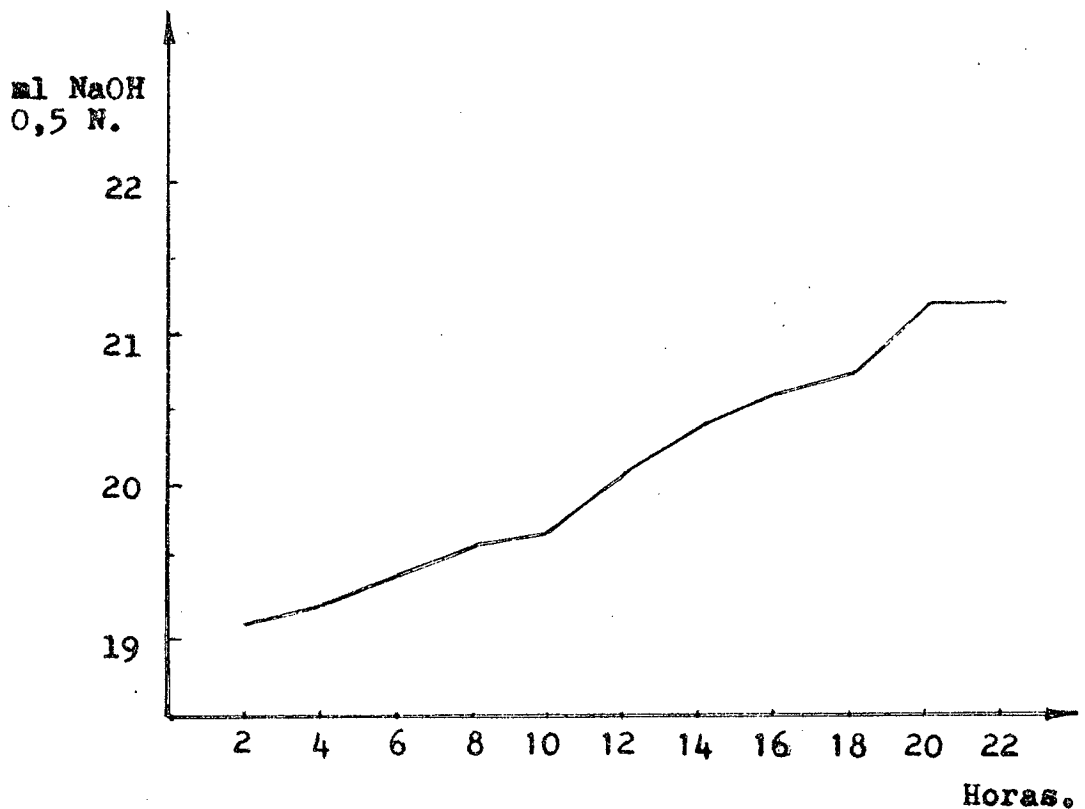
CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION -
(muestra de harina de picos)



CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO ACETICO 5 N
(muestra de harina de uñas)

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da valoración ml de NaOH 0,5 N
2	19,1	1 gota
4	19,2	1 gota
6	19,4	1 gota
8	19,6	1 gota
10	19,7	1 gota
12	20,1	1 gota
14	20,4	1 gota
16	20,6	1 gota
18	20,8	1 gota
20	21,2	1 gota
22	21,2	1 gota

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION
(muestra de harina de uñas)

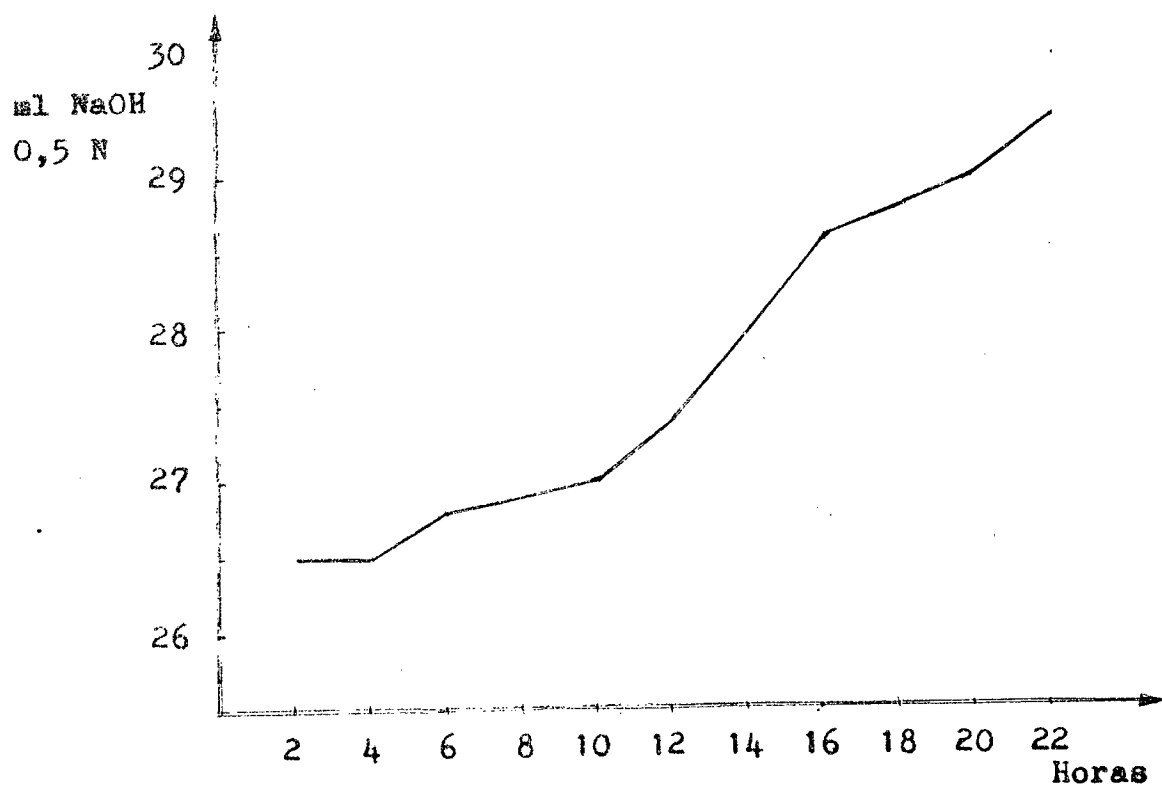


2.2.1.1.2. HIDROLISIS CON ACIDOS INORGANICOS.

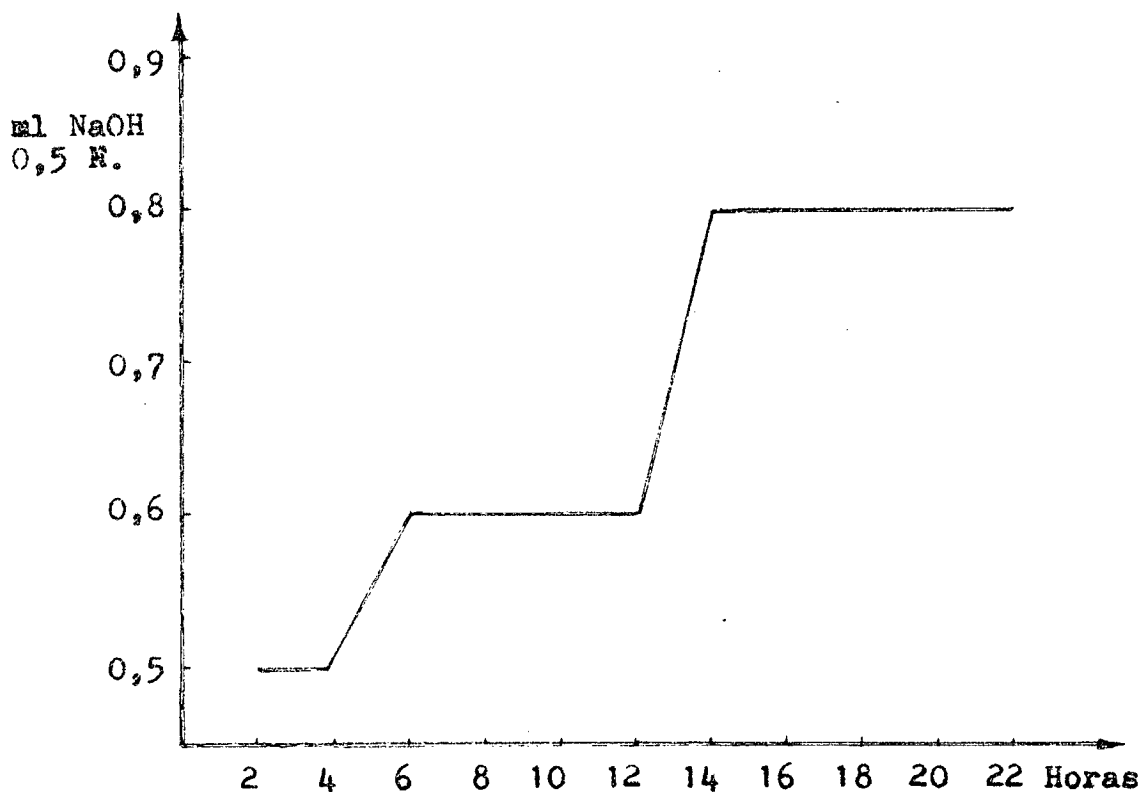
CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO CLORHIDRICO
AL 20,5 % (muestra de harina de picos)

tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da valoración ml NaOH 0,5 N
2	26,5	0,5
4	26,5	0,5
6	26,8	0,6
8	26,9	0,6
10	27,0	0,6
12	27,4	0,6
14	28,0	0,8
16	28,6	0,8
18	28,8	0,8
20	29,0	0,8
22	29,9	0,8

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION
(muestra de harina de picos)



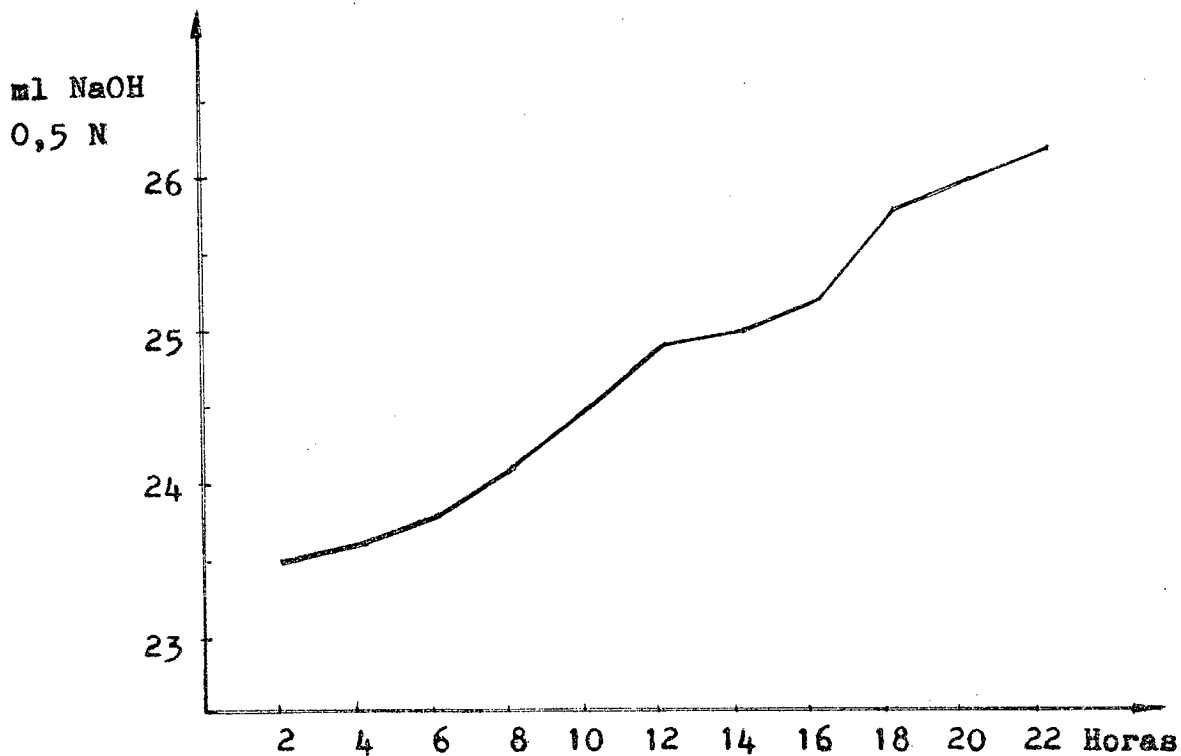
CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA SEGUNDA VALORACION
(muestra de harina de picos)



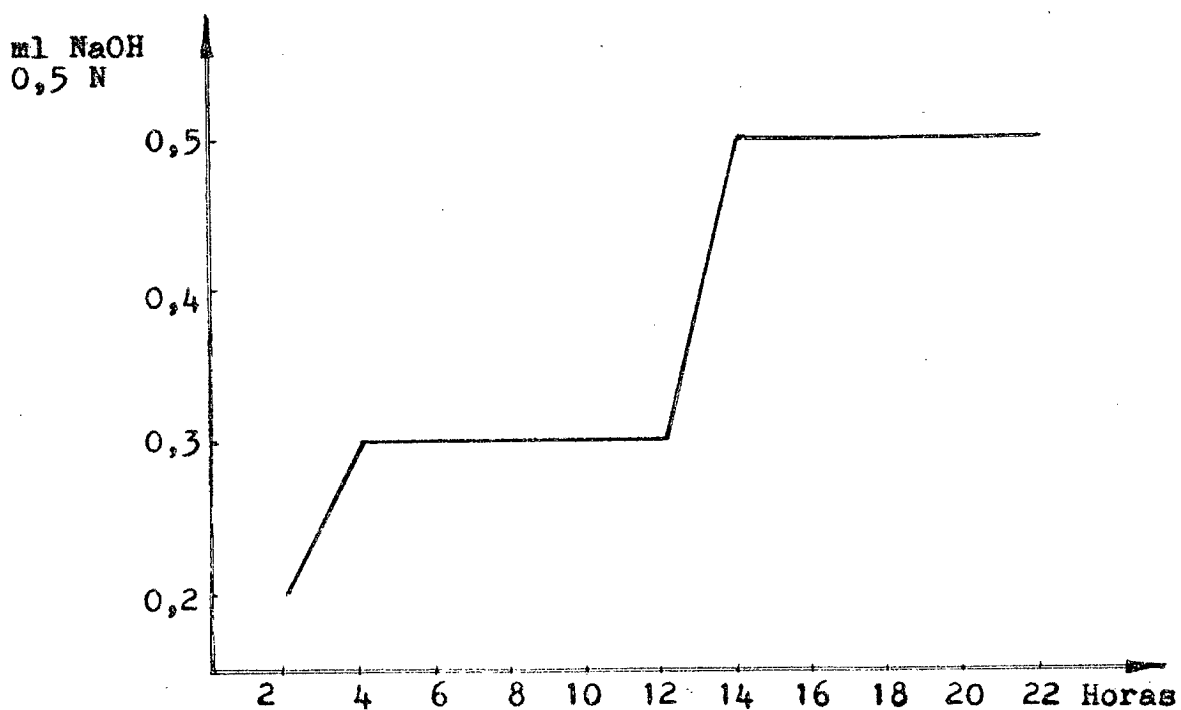
CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO CLORHIDRICO
AL 20,5 % (muestra de harina de uñas)

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da valoración ml NaOH 0,5 N
2	23,5	0,2
4	23,6	0,3
6	23,8	0,3
8	24,1	0,3
10	24,5	0,3
12	24,9	0,3
14	25,0	0,5
16	25,2	0,5
18	25,8	0,5
20	26,0	0,5
22	26,2	0,5

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION
(muestra de harina de uñas)



CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA SEGUNDA VALORACION -
(muestra de harina de uñas)

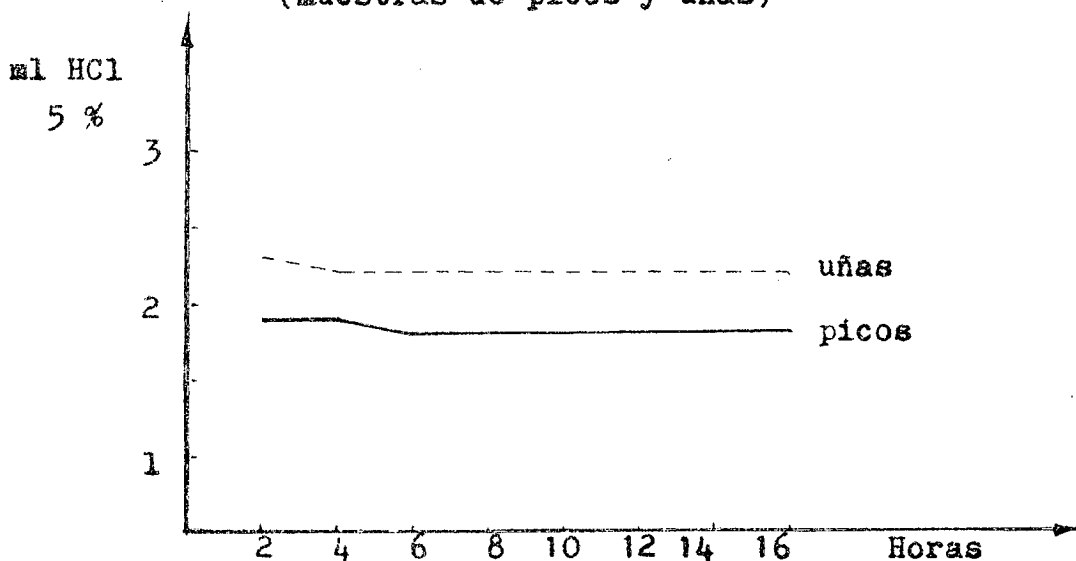


2.2.1.2. HIDROLISIS ALCALINA. Al igual de la harina de plumas, las correspondientes a picos y uñas no presentan facilidad de control volumétrico del proceso razón por la cual el consumo de ácido clorhídrico se mantiene constante, obsérvese las curvas correspondientes.

CONSUMO DE ACIDO CLORHIDRICO AL 5 % EN LA HIDROLISIS CON HIDROXIDO DE SODIO 2 N (muestras de picos y uñas)

Tiempo (horas)	Consumo	
	picos	uñas
2	1,9	2,3
4	1,9	2,2
6	1,8	2,2
8	1,8	2,2
10	1,8	2,2
12	1,8	2,2
14	1,8	2,2
16	1,8	2,2

CURVAS DE CONSUMO DE HCl 5 % EN LA HIDROLISIS CON NaOH 5N (muestras de picos y uñas)



2.2.2. EPIDERMIS (PIEL DE LOS TARSOS).

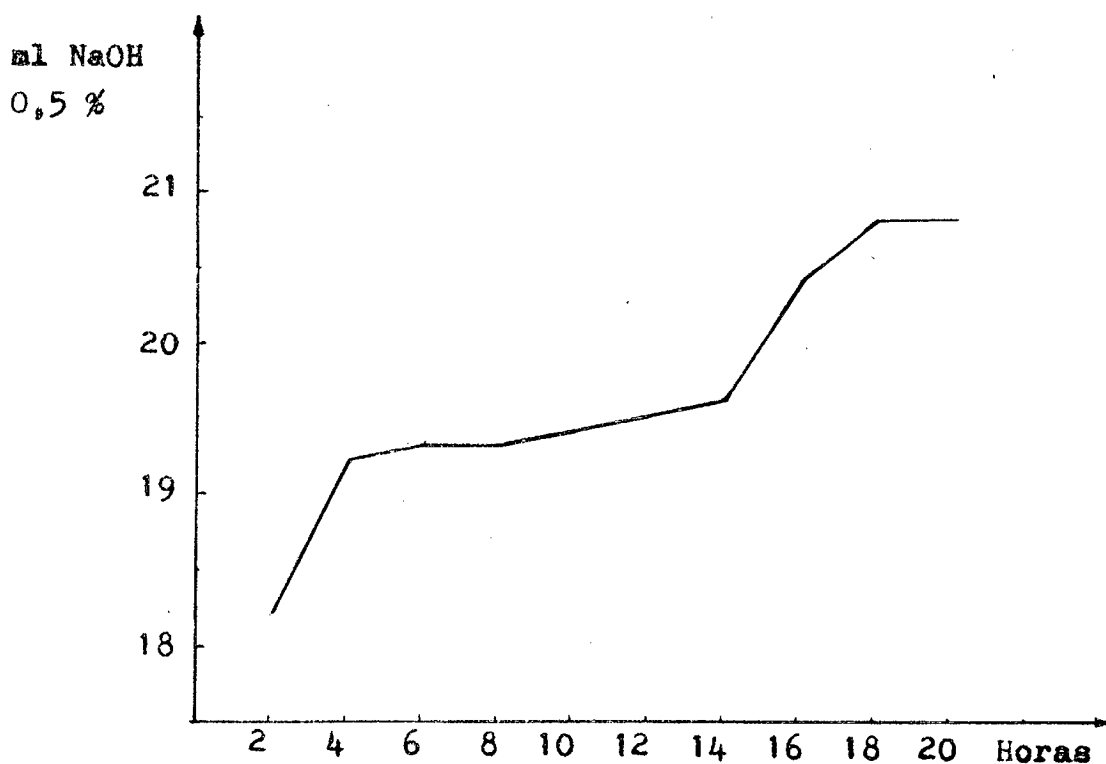
2.2.2.1. HIDROLISIS ACIDA.

2.2.2.1.1. HIDROLISIS CON ACIDO ORGANICO.

CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO ACETICO 5 N
(muestra de harina de piel de los tarsos)

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5 N	2da valoración ml NaOH 0,5 N
2	18,2	1 gota
4	19,2	1 gota
6	19,3	1 gota
8	19,3	1 gota
10	19,4	1 gota
12	19,5	1 gota
14	19,6	1 gota
16	20,4	1 gota
18	20,8	1 gota
20	20,8	1 gota

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION
(muestra de harina de piel de los tarsos)

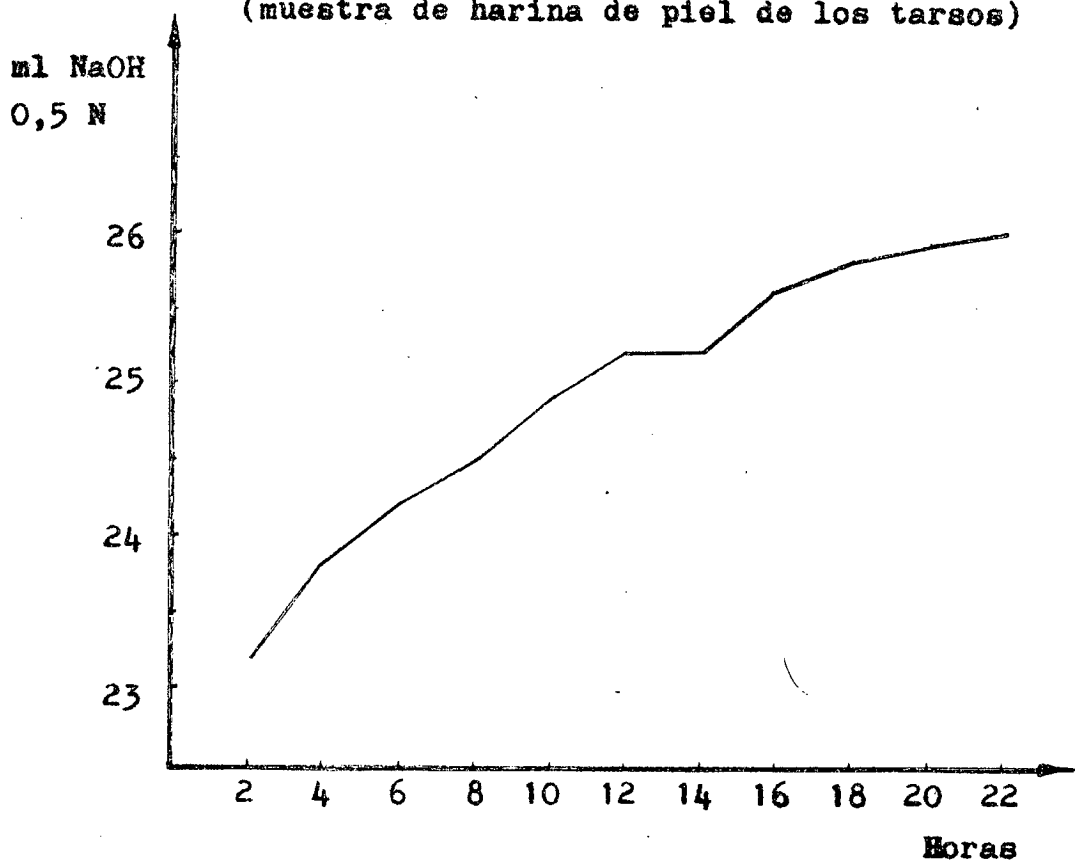


2.2.2.1.2. HIDROLISIS CON ACIDOS INORGANICOS .

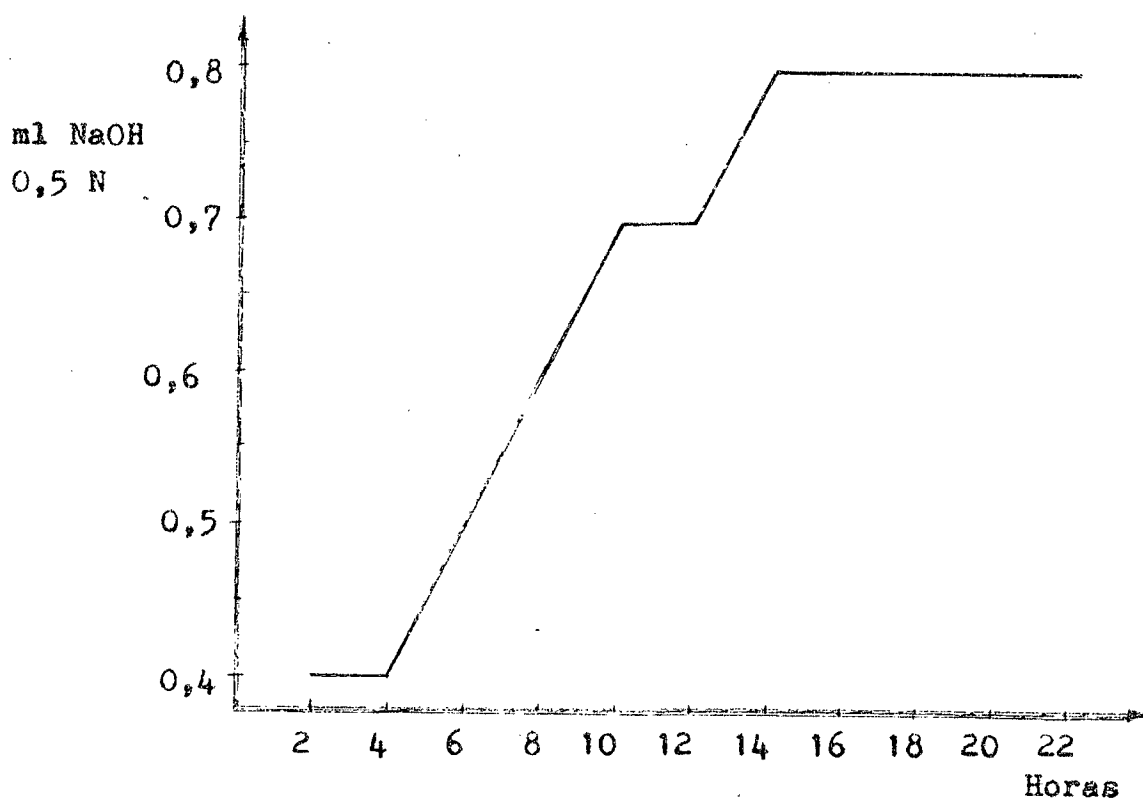
CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA HIDROLISIS CON ACIDO CLORHIDRICO
AL 20,5 % (muestra de harina de piel de tarsos)

Tiempo (horas)	1ra valoración ml NaOH 0,5N	2da valoración ml NaOH 0,5 N
2	23,2	0,4
4	23,8	0,4
6	24,2	0,5
8	24,5	0,6
10	24,9	0,7
12	25,2	0,7
14	25,2	0,8
16	25,6	0,8
18	25,8	0,8
20	25,9	0,8
22	26,0	0,8

CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA PRIMERA VALORACION
(muestra de harina de piel de los tarsos)



CURVA DE CONSUMO DE NaOH 0,5 N EN LA SEGUNDA VALORACION
(muestra de harina de piel de los tarsos)

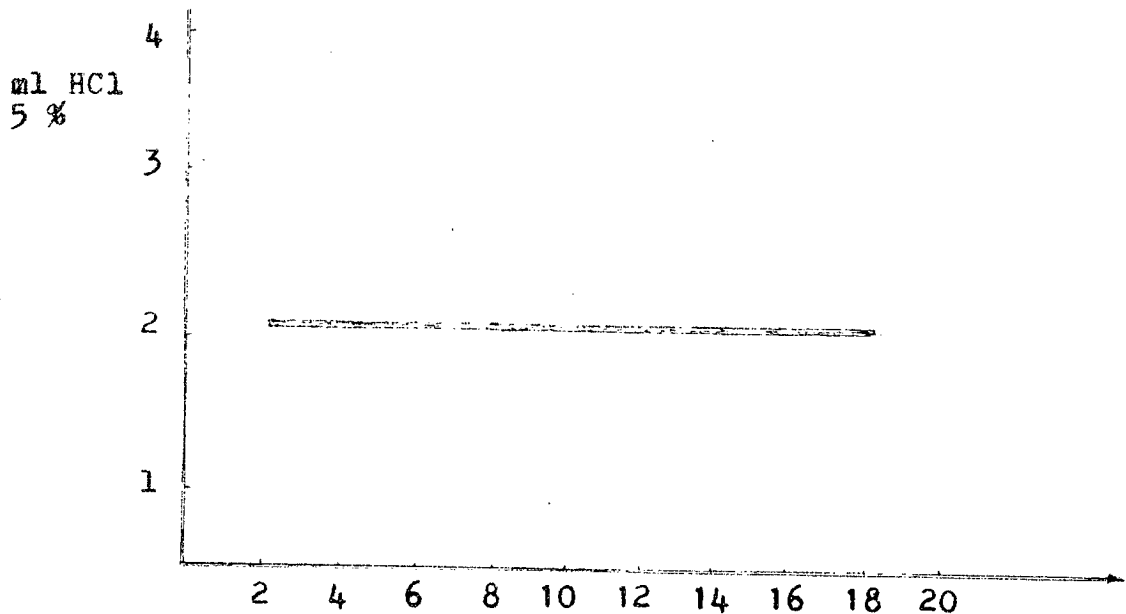


2.2.2.2. HIDROLISIS ALCALINA.

CONSUMO DE ACIDO CLORHIDRICO AL 5 % EN LA HIDROLISIS CON HI-
DROXIDO DE SODIO 2 N (muestra de epidermis de tarsos)

Tiempo (horas)	ml HCl 5 %
2	2,1
4	2,1
6	2,1
8	2,1
10	2,1
12	2,1
14	2,1
16	2,1
18	2,1

CURVA DE CONSUMO DE ACIDO CLORHIDRICO AL 5 % EN LA HIDROLISIS CON NaOH 2 N (muestra e harina de piel de los tarsos)



INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Después de hacer un análisis de los cuadros y curvas - que originan los procesos de hidrólisis con las muestras de análisis, podemos concluir diciendo que dicho proceso es aplicable a muestras ricas en proteínas tales como las referentes a la presente investigación, especialmente cuando se trate de obtener productos a utilizarse como suplementos alimenticios - a base de proteína y singularmente ricos en ciertos aminoácidos.

Todas las muestras presentan las mismas reacciones de acuerdo al tipo de hidrólisis (ácida o alcalina). El mayor beneficio se logra con ácido inorgánico (HCl), pero el uso de ácido orgánico ($\text{CH}_3\text{-CO.OH}$) evita la destrucción del triptófano; además el control volumétrico se lo puede realizar sin mayor dificultad en los dos casos. Todos los procesos se desarrollan entre las 2 a 24 horas de ebullición.



Para el caso de hidrólisis ácida se han realizado valoraciones, debiendo recalcar que para el caso de hidrólisis con ácido orgánico la cantidad de NaOH 0,5 N ocupado en la segunda valoración es prácticamente muy pequeña, dificultándose expresar en ml. Para el caso de hidrólisis con HCl, tanto en la primera valoración como en la segunda existe ascendente consumo de NaOH. El formaldehído cumple la función de destruir posibles estructuras tampón que se producen en el proceso y que impiden la continuación.

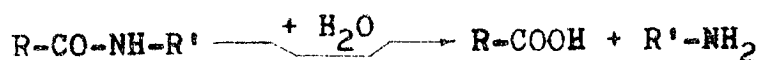
Si bien es cierto que el ácido clorhídrico oxida los aminoácidos sulfurados tales como la cistina y la cisteína produciendo otros compuestos, entonces resulta desventajoso aplicar dicho ácido si se trata de obtener concentrados de sustancias que contengan tales ingredientes.

Por último recordemos que después del proceso resulta fácil eliminar mediante destilación al vacío el ácido clorhídrico previo neutralizado con una base. En definitiva la hidrólisis ácida (orgánica e inorgánica) resulta más ventajosa en relación a la alcalina porque esta última presenta la desventaja de no poderse controlar volumétricamente el proceso de ahí que el consumo de ácido permanece casi constante; para este caso deberá investigarse otro método de control; además, como ya se dijo antes que los álcalis originan racemización de ciertos aminoácidos, otros se desaminan y la cistina y cisteína se destruyen. Si la hidrólisis se produce, no se lograrán productos ricos en ciertos aminoácidos, sino más bien concentrados de aminoácidos que presentan resistencia a la acción de los álcalis especialmente el hidróxido de sodio.

2.3. SISTEMAS DE CONTROL DE LA HIDROLISIS.

Los sistemas de control de procesos de hidrólisis se encargan de vigilar el grado de degradación de las proteínas. dicho control se puede desarrollar volumétricamente, pero es un sistema que sólo da resultados cualitativos.

2.3.1. REVISION DE TECNICAS APROPIADAS. El proceso de hidrólisis de proteínas consiste en la disociación de los enlaces péptidos y de amida de acuerdo a la siguiente reacción:



La extensión de la hidrólisis se puede llegar a conocer en cualquier momento midiendo el aumento en grupos carboxilo o grupos amina, o de ambos. 6

2.3.1.1. VOLUMETRICA. En el proceso de hidrólisis, el aumento de grupos amina se puede medir por valoración volumétrica con disolución de álcali en presencia de formaldehído o etanol; es decir cuando el proceso de ebullición se realiza en presencia de ácido clorhídrico o acético, inorgánico y orgánico respectivamente. La valoración en presencia de formol fué utilizada por primera vez por Sørensen y se explicó originariamente como una formación de compuestos N-metilo de la estructura R-N=CH_2 . Lo más probable es que se formen compuestos de tipo monometilol o tipo dimetilol, o sea, R-NH-CH_2 o $\text{R-N(CH}_2\text{OH)}_2$, respectivamente. La basicidad aparente de los grupos amínicos se reduce notablemente de esta forma. Los ácidos N-hidroximetilamínicos pueden ser valorados volumétricamente con álcali y fenolftaleína de la

misma manera que los ácidos grasos. Por consiguiente, cada equivalente de álcali consumido corresponde a un equivalente de enlace péptido disociado. La valoración en presencia de alcohol tiene validez gracias al factor pK de la fenolftaleína utilizada como indicador; mientras el cambio de color aparece en disolución acuosa a lo largo de un amplio intervalo de pH, en las cercanías de pH 9, en donde muchos de los aminoácidos están todavía en forma protónica, en disoluciones alcohólicas el cambio se produce en las proximidades de pH 12 y dentro de un estrecho valor de pH. A este alto valor de pH llega a producirse la reacción:



2.3.1.2. OTRAS TECNICAS. El aumento de grupos amínicos durante la hidrólisis se puede determinar mediante el método VAN SLIKE, que se basa en la reacción del ácido nitroso con los grupos amínicos primarios para formar nitrógeno gaseoso.⁶



Los grupos alfa-amínicos de los aminoácidos y los grupos terminales alfa-amínicos de los péptidos reaccionan rápidamente con el ácido nitroso; sin embargo los grupos amínicos de la lisina reaccionan muy lentamente. Se logra también una formación lenta de nitrógeno gaseoso a expensas del amoníaco que es producido por el ácido clorhídrico a partir de los grupos amida de la asparragina y de la glutamina. El volumen de nitrógeno que se forma se puede medir a presión atmosférica o manométricamente a presión reducida.

El método VAN SLIKE proporciona excelentes resultados-

con la mayoría de los aminoácidos y los péptidos; sin embargo hay que tener cuidado con la circunstancia de que el ácido nítrico se convierte en nitrógeno por la acción de sustancias fuertemente reductoras tales como la cisteína. La glicina y sus péptidos también producen nitrógeno en exceso en comparación con los valores teóricos.¹⁵

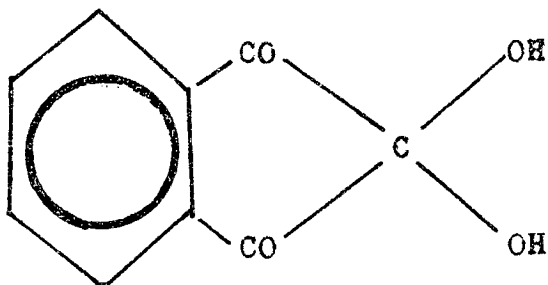
Puesto que los aminoácidos se comportan como ácidos más débiles que los péptidos la hidrólisis enzimática de los péptidos se ve acompañada de una débil disminución de acidez.

Si se encuentran presentes el dióxido de carbono y el bicarbonato, se produce una absorción de anhídrido carbónico y se puede tomar la disminución de la presión del anhídrido carbónico como una medida del grado de hidrólisis. De esta forma se puede medir manométricamente el proceso de hidrólisis enzimática en el aparato de Warburg.⁶

Mientras los métodos antes descritos, permiten determinar el grado de liberación de los grupos amina y carboxilo durante la hidrólisis, estos métodos no proporcionan ningún medio de distinguir entre los aminoácidos libres y los péptidos tal diferenciación hay que lograrla mediante reactivos que reaccionan con los grupos alfa-amino de la misma molécula de aminoácido al mismo tiempo.

El más importante de estos reactivos es el tricetohidríndeno, que se conoce con el nombre comercial de nihindrina. Si se calienta nihindrina con una solución de aminoácido, el aminoácido se oxida a CO_2 , amoníaco y un aldehído que contiene un átomo de carbono menos que el aminoácido. Al mismo tiempo el grupo cetónico hidratado >C(OH)_2 de la nihindrina-

se reduce a grupo alcoholico >CHOH .



NIHINDRINA

Esta forma reducida de la nihindrina se combina con el exceso de la forma cetónica hidratada y amoníaco para dar un colorante purpúreo o azul, cuya concentración se puede medir colorimétricamente. Si se practica el calentamiento con nihindrina a pH 1 - 5, se puede medir la cantidad de aminoácido libre midiendo el anhídrido carbónico desprendido. Aún cuando las proteínas y los péptidos, lo mismo que el amoníaco y las aminas, producen un color azul con la nihindrina, ninguno de ellos forman anhídrido carbónico cuando se calientan con nihindrina. Por este motivo los aminoácidos libres se pueden determinar según este método en presencia de proteínas o de péptidos.⁶

2.3.2. TECNICAS ACONSEJADAS. De acuerdo a los detalles enunciados en cada una de las técnicas antes mencionadas, podemos concluir agregando que un proceso de hidrólisis de proteínas puede ser valorado o comprobado si se producen las diferentes reacciones de degradación.

La técnica que presenta mayores posibilidades de desarrollo en un laboratorio es la volumétrica, la misma que se practica titulando muestras cada dos horas de ebullición, di

cho proceso será positivo cuando el consumo de álcali sea ascendente, refiriéndose a la hidrólisis ácida.

Si se utiliza la disminución de presión del dióxido de carbono como medida del grado de hidrólisis se debe tomar en cuenta que se trata de un proceso favorable para hidrólisis enzimática.

El método VAN SLIKE consiste en la reacción química del ácido nitroso con los grupos amínicos primarios, donde deberá liberarse el nitrógeno en forma de gas, el inconveniente se presenta cuando en el concentrado de hidrolizado se encuentran sustancias reductoras como la cisteína; el propio ácido nitroso a veces se convierte en nitrógeno y esto ocasiona un valor negativo dentro de lo que se persigue. Por otro lado resulta complejo el proceso de medición de la cantidad de nitrógeno producido.

Ninguno de los métodos de control antes mencionados sirven para distinguir la clase de aminoácidos y péptidos son los que se degradan, más bien son técnicas que nos permiten determinar el grado de liberación de los grupos amina y carboxilo.

Tomando en cuenta todos los factores positivos y negativos de cada una de las técnicas resulta más aconsejable el control volumétrico como medida de avance de un proceso de hidrólisis.

CAPITULO III

TECNICAS DE SEPARACION Y PURIFICACION

El presente estudio nos lleva a la investigación de formas adecuadas de obtener sustancias protéicas puras. Para este efecto se trata de separar las diversas sustancias ajenas a las proteínas; desde este punto de vista un método de separación puede ser considerado también como método de purificación o viceversa.

3.1. TECNICAS DE SEPARACION.

Puesto que la mayoría de las proteínas son extremadamente sencibles al calor, a los ácidos, bases, disolventes orgánicos, y en algunos casos incluso al agua destilada, los métodos generalmente empleados para el aislamiento de otros tipos de compuestos orgánicos difícilmente podrán ser empleados en la química de las proteínas.

Las proteínas celulares insolubles, frecuentemente llamadas escleroproteínas, se pueden preparar fácilmente por extracción de la célula con agua y con disolventes orgánicos para separar las grasas, los hidratos de carbono y las proteínas solubles. Frecuentemente es necesaria una extracción con disoluciones diluidas de cloruro sódico o bicarbonato sódico puesto que algunas de estas proteínas solubles solo se disuelven en presencia de sales neutras. Si la proteína insoluble es resistente a las enzimas proteolíticas se consigue un nuevo paso de purificación mediante tratamiento con pepsina a pH 1 a 2 o con tripsina a pH 8 a 9. De esta forma la queratina, la proteína insoluble de los tejidos córneos (tales como los cuernos o los cabellos), llega a ser preparada. Pueden aparecer dificultades cuando las proteínas insolubles se encuentran acompañadas por hidratos de carbono insolubles, tales como la quitina o la celulosa.

La queratina se puede solubilizar por reducción de sus enlaces tipo ditio con sulfuros o compuestos de sulfhidrilo, el colágeno por tratamiento por colagenasa o hirviendo con agua, la fibroína con disoluciones concentradas de bromuro de litio o con ácido dicloroacético. No obstante los productos solubilizados no son idénticos al material original; se han degradado parcialmente. Todas las proteínas insolubles pueden solubilizarse también calentándolas con una disolución muy diluida de hidróxido sódico, mientras que la mayoría de los hidratos de carbono resisten a este tratamiento. Naturalmente las proteínas se degradan drásticamente por medio del hidróxido de sodio y se convierten en una mezcla de productos de menor peso molecular. Las escleroproteínas no se pueden purificar por cristalización debido a su insolubilidad. Es imposible asegurar, por tanto, si las preparaciones obtenidas por los métodos usuales son de naturaleza uniforme o mezclas de varias proteínas diferentes.

El aislamiento y purificación de las proteínas solubles lleva consigo su extracción a partir de las células por medio de disolventes apropiados y su precipitación alterando la concentración de las sales y/o iones hidrógeno, o bien por adición de disolventes orgánicos. En muchos casos ha sido posible obtener precipitados cristalinos mediante estos procedimientos. Al objeto de evitar la desnaturalización de la proteína que ha de aislarse se debe trabajar a bajas temperaturas; las disoluciones de muchas proteínas sufren desnaturalización incluso a temperatura ambiente. Esto se aplica especialmente a las disoluciones de proteínas mantenidas en agua sin ningún contenido salino. El grado de desnaturalización se reduce mediante la adición de sales neutras. Por ejemplo-

la tripsina cristalina se puede almacenar en una disolución saturada de sulfato de magnesio. El grado de desnaturalización se reduce también almacenando la disolución de proteína a bajas temperaturas. Los refrigeradores, las centrifugas refrigeradas y las habitaciones frías, por consiguiente, constituyen una parte importante del equipo requerido para la preparación de proteínas.

A bajas temperaturas se reduce un segundo peligro: la descomposición bacteriana. Las disoluciones de proteína constituyen un excelente medio nutritivo para las bacterias y siempre se infectan y se destruyen si se conservan a temperatura ambiente. Como consecuencia de la termolabilidad de las disoluciones de proteínas resulta imposible esterilizarlas por medio del calor. La infección bacteriana y su desarrollo se puede inhibir mediante el uso de desinfectantes, pero estos desinfectantes pueden formar compuestos con las proteínas lo que da lugar a que se alteren sus propiedades físico químicas o que las proteínas se desnaturalicen. Siempre que sea posible las bacterias deben separarse de las disoluciones de proteínas por centrifugación a alta velocidad o por filtración a través de filtros Seitz o Berkefeld o a través de capas de filtros. La filtración tiene como desventaja que pequeñas proporciones de proteínas quedan adsorbidas en el filtro poroso y se pierden por desnaturalización.

El mejor método para guardar las disoluciones de proteínas a lo largo de prolongados períodos de tiempo es congelarlas y conservarlas a aproximadamente -10°C a -20°C o a temperaturas más bajas. A estas temperaturas las bacterias no se pueden multiplicar por lo que se hace innecesario esterilizar

zar las disoluciones. Los sueros inmunes y las disoluciones de enzimas pueden conservarse en los laboratorios por periodos de meses y hasta años sin perder su actividad biológica. No obstante, puede aparecer una inactivación o desnaturalización cuando se congela y descongela repetidamente alguna de las proteínas más lábiles (lipoproteínas, anticuerpos purificados, ovoalbúmina pura).

Puesto que las membranas celulares son impermeables para las moléculas de proteínas en forma masiva constituye un verdadero prerequisite el que estas membranas se destruyan antes de proceder a la extracción de las proteínas solubles. Se puede lograr la destrucción de las células mecánicamente triturándolas con arena o kieselguhr. En estos métodos es posible que una parte de la proteína se adsorva sobre las partículas de silicato y que se produzca algo de desnaturalización por lo tanto es preferible destruir las células con molinos apropiados. La estructura celular se destruye también por acción de disolventes orgánicos tales como el alcohol, la acetona o el glicerol. Si la concentración de glicerol no excede al 85 % pasará al extracto de glicerol una gran porción de la proteína soluble. Los enzimas hidrolíticos pueden ser extraídos del páncreas y otros órganos por este procedimiento. Los extractos de glicerol son algo estables a temperatura ambiente. Parece como si el grado de desnaturalización se redujese por una laxa asociación de las moléculas de glicerol con la proteína como consecuencia de los grupos hidroxilo de carácter polar de la glicerina. Si se usa acetona para la destrucción de las células es necesario cortar en capas delgadas el órgano sometido a extracción y triturarlo en un molino; entonces se coloca la pulpa en 5 - 10 volúmenes de acetona y se so

mete a una agitación vigorosa. De esta forma se obtiene un medio que contiene el 80 - 90 % de acetona en el cual no se desnaturalizan fácilmente las proteínas, a diferencia de lo que ocurriría si la concentración de acetona fuera menor. Este procedimiento presenta como ventaja el hecho de que las células se destruyen y que la mayoría de los lípidos son extraídos por la acetona. Los lípidos se pueden separar cuantitativamente mediante un tratamiento posterior con éter libre de peróxido. El residuo extraído se puede secar extendiéndolo sobre papel de filtro y luego extrayéndolo con agua o con soluciones diluidas de sales o amortiguadores. Mientras muchas proteínas y enzimas importantes resisten la acción de la acetona, otras proteínas menos estables se desnaturalizan por la acción de este disolvente.

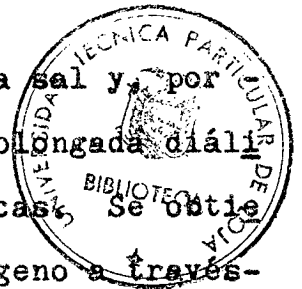
El método mejor y más simple de destruir las membranas celulares es la desintegración por repetidas congelaciones y descongelaciones. Como se forman partículas de hielo puro, durante la congelación crece la concentración de las sales y los líquidos celulares y las membranas celulares se rompen a causa del aumento de presión osmótica y de las lesiones mecánicas producidas en las membranas celulares por las partículas de hielo. Se puede conseguir también la destrucción de las células triturándolas o triturando los tejidos con sales neutras secas.

Los extractos, preparados por medio de algunos procedimientos descritos antes se centrifugan para separar las partículas insolubles. Las sales, el glicerol y otras sustancias de peso molecular bajo, se pueden separar por diálisis frente a agua destilada. Las euglobulinas y muchas de las proteínas

vegetales son insolubles en agua que no contenga sal y, por tanto, se obtienen como precipitado tras una prolongada diálisis. Se puede disolver en disoluciones isotónicas. Se obtiene oxihemoglobina cristalina cuando se pasa oxígeno a través de una disolución dializada libre de sal de hemoglobina equina reducida. Este fenómeno demuestra de manera bien patente que la solubilidad de proteínas depende en gran manera de muy pequeños cambios en sus moléculas, como en el ejemplo expuesto al reemplazar una molécula de agua por una de oxígeno como uno de los ligandos del átomo de hierro.

Hace tiempo se practicaba la diálisis mediante el uso de membranas de origen animal (tripa), papel pergamino o membranas de colodión. La mayor desventaja de las membranas de origen animal es la falta de homogeneidad, mientras que el papel pergamino y el colodión tienen como desventaja el alto contenido de ácido sulfúrico y de grupos éster del ácido nítrico. Muchas proteínas se desnaturalizan por adsorción sobre esos grupos. El mejor material que se puede usar hoy día en los dializadores es la celulosa que es obtenible comercialmente como celofana. El pequeño tamaño de sus poros hace que la velocidad de difusión sea muy pequeña, aumentando con ello el tiempo requerido para efectuar la diálisis y, como consecuencia, el peligro de infección bacteriana. Es aconsejable, por tanto, realizar la diálisis en el refrigerador. El diámetro de los poros de la celofana se puede aumentar tratando la membrana con disoluciones acuosas de cloruro de cinc.

Se pueden preparar fácilmente dializadores de diferentes tamaños atando los tubos en uno o en ambos extremos en forma de sacos del tamaño deseado. Se puede reducir conside-



rablemente el tiempo de la diálisis agitando el líquido exterior o con mecanismos de balanceo.⁶

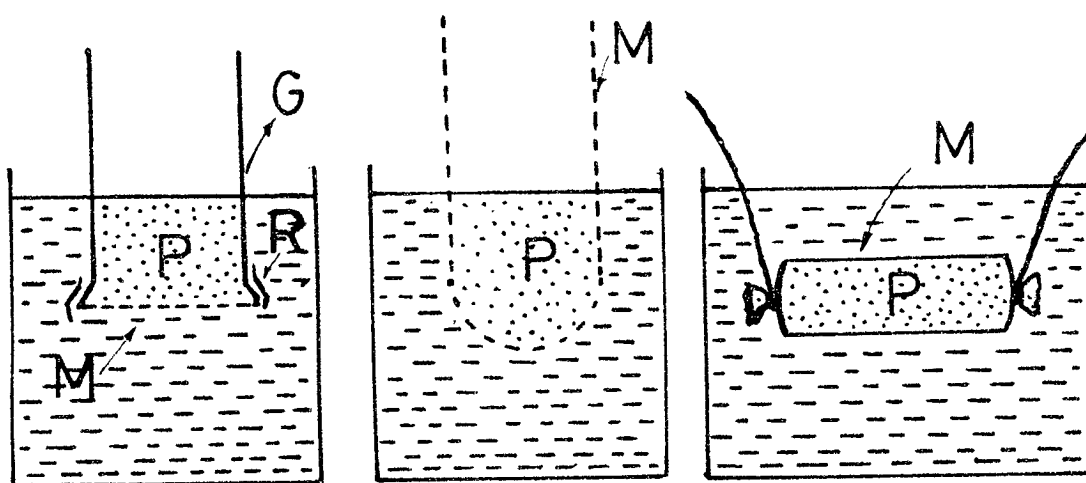


Fig. 3.1. Tres tipos de membranas para diálisis. G: tubo de vidrio; M: membrana; R: banda de caucho; P: disolución de proteína.

"Si el propósito es simplemente eliminar las sales se puede seguir el siguiente método: el tubo de diálisis que contiene la disolución de proteína se suspende horizontalmente a unos pocos milímetros bajo la superficie de un volumen de agua destilada y se mantiene en un refrigerador. Por su mayor densidad las sales se difunden rápidamente hacia abajo, hacia el fondo del recipiente y la bolsa de diálisis permanece rodeada de agua destilada libre de sal.¹

El alto gradiente de concentración causa una diálisis rápida y en el fondo del recipiente se colecta una disolución concentrada de material dializable. Después de 10 - 15 horas se vacía el recipiente, se enjuaga y se llena de nuevo con agua destilada nueva y se repite el proceso hasta que se eliminan las sales de la disolución de proteína. Naturalmente este proceso no se puede usar para efectuar una diálisis frente

1. Felix Haurowitz, "QUIMICA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS", p. 9

a disoluciones salinas o amortiguadas. Se puede conseguir un aumento de la velocidad de la difusión mediante electrodiálisis; sin embargo se deben evitar toda clase de reacciones ácidas o alcalinas cerca de la superficie de las membranas que separan la disolución de proteína de los líquidos anódicos o catódicos respectivamente. Se desnaturaliza una considerable porción de proteína cuando la reacción se hace fuertemente ácida o alcalina.

La diálisis de las proteínas puede reemplazarse frecuentemente por la filtración a través de columnas de geles de dextrano con enlaces entrecruzados que se pueden adquirir comercialmente bajo el nombre de Sephadex.

Estos geles forman una estructura como una esponja que atrapa en sus orificios y cavidades los pequeños iones y moléculas dializables y por consiguiente retarda su elución, mientras que las grandes moléculas de proteína pasan en las primeras porciones del eluato. El gel de dextrano es estable entre los valores de pH 2 - 10 y constituye por esta razón un auxiliar muy valiosos en la separación y purificación de las proteínas. 9

AISLAMIENTO DE LAS PROTEINAS A PARTIR DE SUS DISOLUCIONES. -

Algunas proteínas precipitan a partir de sus disoluciones mediante diálisis; otras se precipitan al añadir sales neutras a sus disoluciones (método de separación por tratamiento salino; conocido en inglés como "salting-out" method). El procedimiento usual consiste en ajustar primeramente el pH de la disolución hasta la reacción isoeléctrica de una proteína en particular en cuyo punto la solubilidad de una proteína

pasa por un valor mínimo entonces se añade sulfato amónico ó sulfato sódico. Puesto que las diferentes proteínas se pueden separar a diferentes concentraciones salinas, es posible practicar un fraccionamiento aplicando incremento de sal, paso a paso. Si la concentración salina es muy alta, la multiplicación bacteriana se reduce drásticamente e incluso se puede trabajar a temperatura ambiente. De esta forma la ovoalbúmina o la albúmina del suero puede ser obtenido en forma cristalizada añadiendo lentamente pequeñas cantidades de estas sales a sus disoluciones isoeléctricas hasta que la disolución tratada se vuelve opalescente. La turbidez se aclara añadiendo un pequeño volumen de agua y entonces la disolución se mantiene a temperatura ambiente. Debido a la lenta evaporación del agua se van formando lentamente los cristales de albúmina y se van depositando en el fondo del vaso que contiene la disolución. Si se añade un exceso de sal se forma un precipitado amorfo de proteínas. Se pueden obtener también cristales por diálisis de la disolución de proteína frente a una disolución saturada de sulfato amónico. 6

ELIMINACION DEL AGUA. Las disoluciones de sustancias más estables pueden ser concentradas por evaporación sobre baño maría o a presión reducida; ninguno de estos métodos puede ser empleado al tratar con proteínas. El calentamiento en el baño maría provoca la desnaturalización de la mayoría de las proteínas, aunque algunas de las proteínas de moléculas más pequeñas, como la tripsina o la ribonucleasa son resistentes frente a breves calentamientos a definido pH y a definida fuerza iónica. La destilación a presión reducida no se puede emplear para concentrar las disoluciones de proteínas puesto que se produce espuma en esas condiciones.

Pequeños volúmenes de disoluciones de proteínas se pueden con centrar en desecadores fácilmente a presión reducida, colocán dolas sobre grandes cantidades de sustancias ávidas de agua. Para reducir el volumen de grandes cantidades de disoluciones de proteínas la disolución se puede colocar en una bolsa de celofana que se suspende en el aire frente a un ventilador eléctrico (preevaporación). Al irse evaporando el agua de la superficie de la bolsa la disolución de proteína se va hacien do más concentrada. Sin embargo algunas de las proteínas pue den sufrir desnaturalización superficial. Se obtienen mejores resultados por ultrafiltración, o sea, aplicando presión posi tiva o negativa durante la diálisis, o por diálisis frente a polivinilpirrolidona, carbowax (polietilenoglicol) o sephadex.

Otro método que puede ser aplicado a grandes volúmenes de disoluciones de proteína se basa en congelar la disolución y descongelar el producto sólido muy lentamente, sin agitar ni mover. Los cristales de hielo impiden a la proteína que ascienda a la superficie de la disolución, mientras que el conjunto de la proteína se va concentrando en la disolución que permanece en la parte baja del recipiente. Se sifona la disolución concentrada de proteína y se puede someter a repe tición del mismo procedimiento hasta que se consiga una alta concentración de proteína. La hemoglobina humana es una subs tancia que se puede obtener en forma cristalina por este pro cedimiento.

El mejor método para la concentración de grandes volúmenes de proteínas es el desecado por congelación (liofilización). La disolución de proteína se congela en un frasco o recipiente de fondo redondo y se somete a un alto vacío en la

presencia de un área fría mantenida a unos -70°C por medio de una mezcla de anhídrido carbónico sólido (hielo seco) y acetona. El hielo se sublima desde la disolución congelada de proteína y se condensa en la superficie fría. La proteína se obtiene en forma de un polvo seco al aire y usualmente en el estado nativo. Las disoluciones diluidas de proteínas se pueden concentrar muy eficientemente por adsorción en una columna de intercambio iónico y subsecuente elución con pequeños volúmenes de disoluciones salinas.⁶

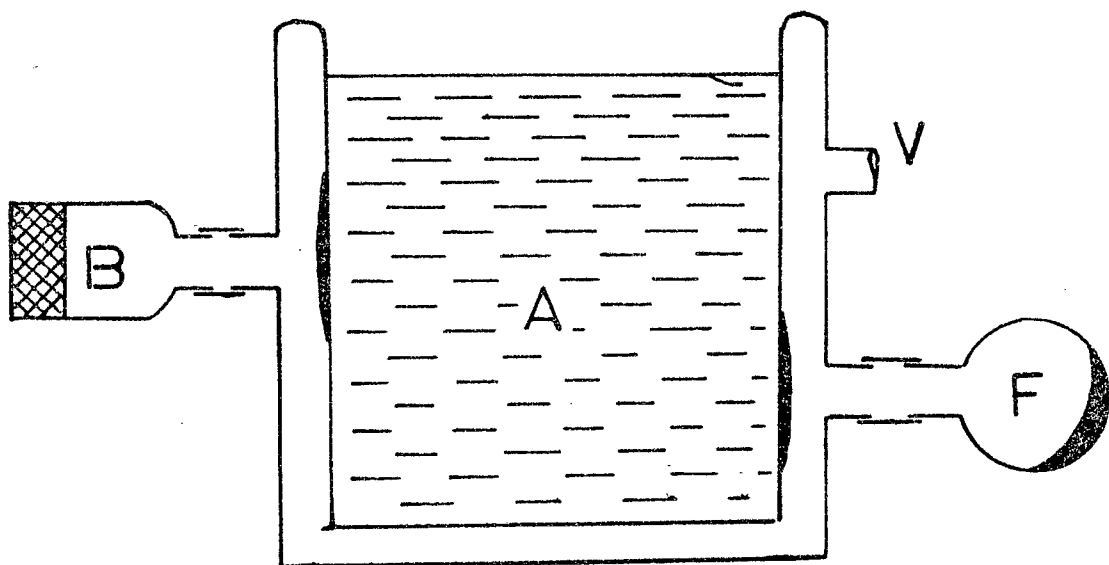


Fig. 3.2. A: mezcla de hielo seco y acetona a -70°C ; V: salida a una bomba de alto vacío; F: frasco; B: botella. Las disoluciones se congelan en B y F; su agua se evapora bajo condiciones de alto vacío y se condensa y se congela dentro del aparato de liofilización debido a la baja temperatura existente en A. La proteína se obtiene en forma de polvo en F y B.

3.1. TECNICAS DE PURIFICACION

La separación de los aminoácidos presenta muchas dificultades, se funda en la diferente solubilidad de los ácidos y sus sales, la formación de sales de ácido fosfotungstácico,-

la cristalización fraccionada de aminoácidos, de sus sales o amidas o de complejos con ciertos metales (Cu, Ag). Los trabajos de Fisher representaron un avance notable para estos fines: Esterificación del hidrolizado y destilación fraccionada de los ésteres derivados de los aminoácidos neutros.

Otro método se funda en la solubilidad de los aminoácidos neutros en butanol normal, en tanto que los ácidos y los básicos son casi insolubles.

Igualmente se utilizan los métodos electroforéticos, - las resinas cambiadoras de iones. Pero los más empleados actualmente son los métodos cromatográficos. El cromatograma obtenido, una vez seco, se rocía con nihindrina, que revela la presencia de los componentes ácidos (coloración azul o violeta) la nihindrina es el hidrato de tricetohidrindeno, uno de los pocos ejemplos de hidrato de cetona (dos OH en un mismo C).

Por último se pueden citar los métodos microbiológicos y los que se fundan en el uso de izótopos.

La purificación sistemática de proteínas por medio de disolventes orgánicos fué presentada y elaborada con todo éxito por Cohn y sus colaboradores. La aplicación metódica de etanol y otros disolventes orgánicos se basa en el hecho de que estos disolventes reducen la constante dieléctrica de las disoluciones acuosas de proteínas. Se consigue el efecto contrario, es decir, el aumento de la constante dieléctrica, mediante la adición de glicina. El método del alcohol es superior a otros métodos cuando las proteínas han de ser preparadas en gran escala puesto que la mayoría del alcohol se puede

separar fácilmente por evaporación o filtración, mientras que la eliminación de sales por diálisis requiere mucho tiempo y es trabajo laborioso. La característica esencial de este nuevo método es, no obstante, la variación sistemática y vigilancia estricta de la fuerza iónica, la concentración de iones hidrógeno, la temperatura y la constante dieléctrica de la disolución. Variando estos factores ha sido posible aislar un gran número de nuevas proteínas a partir del suero sanguíneo.

9

"La preparación de una proteína pura a partir de sus mezclas se ha visto facilitada en algunos casos por la desnaturalización selectiva de otras proteínas presentes. - Por ejemplo la tripsina pura fué purificada calentando sus disoluciones con ácido clorhídrico 0,5 N a 90°C. De esta forma se eliminaron las proteínas inertes!"₂

Durante los últimos años se han desarrollado métodos - extremadamente poderosos para el fraccionamiento de mezclas - de proteínas. El que más se usa entre ellos es el fraccionamiento de proteínas por cromatografía sobre columnas de intercambio iónico. Otro método importante es la cromatografía - por partición, que antes se había usado para separación de aminoácidos y péptidos. La cromatografía por partición se basa en la distribución de un soluto entre dos fases líquidas - parcialmente miscibles, tales como agua y butanol o agua y fenol. Puesto que muchas de las proteínas se desnaturalizan - por la acción de los disolventes orgánicos, estos métodos se pueden aplicar solamente a las moléculas de proteína más pequeñas y más estables. Se ha rebajado el peligro de la desnaturalización utilizando éteres de glicol como fase orgánica.- Así, Pórter tuvo éxito al fraccionar las globulinas por croma

2. Felix Haurowitz, "QUIMICA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS", p. 13

tografía de partición usando una disolución de ftalato potásico a pH 9 y a $-3,1^{\circ}\text{C}$ como fase acuosa y metilcelosolve (éter--glicolmonometílico, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$) como fase no acuosa. Esta técnica es difícil y su aplicabilidad limitada.

Hasta hace poco no se ha podido disponer de métodos para el aislamiento de todos los aminoácidos. Anteriormente era necesario contentarse con la separación de ciertos aminoácidos por ejemplo los aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina se precipitaban con ácido fosfowolfrámico y se separaban entre sí por precipitación con sulfato de plata a diferentes valores de pH. El procedimiento principal utilizado para el fraccionamiento de las mezclas de ácidos monoamínicos fué la destilación fraccionada de sus ésteres. La destilación daba lugar a grandes pérdidas, con lo que los resultados se apartaban grandemente de lo que podrían llamarse resultados cuantitativos. Pero fué precisamente por este método por el que se estableció de manera concluyente la estructura de las proteínas como similar a la de los péptidos y también su contenido en aminoácidos.

En años recientes se han desarrollado nuevos métodos de fraccionamiento de hidrolizados de proteína. Se han utilizado las variaciones del coeficiente de partición de los aminoácidos entre el agua y el butanol, fenol o colidina para llegar a su resolución. Incluso si la solubilidad de varios aminoácidos es casi la misma en agua o en los disolventes orgánicos su distribución entre el agua y el disolvente orgánico será diferente. Si se usa papel, almidón u otra fase sólida hidrofílica se producen fenómenos de adsorción en la zona interfacial sólido líquido. Sin embargo la relación de solvente orgánico-

a agua en la zona interfacial puede que sea diferente de la misma relación en el conjunto de la fase líquida móvil. Por consiguiente, los diferentes aminoácidos se mueven con velocidades distintas sobre la superficie del papel o a través de las columnas cromatográficas.

En cromatografía de papel se coloca una pequeña cantidad de hidrolizado de proteína sobre una línea a unos 6 centímetros del final de una tira de papel. Se sumerge este extremo dentro de una mezcla de disolventes y se coloca todo el sistema dentro de un recipiente de vidrio cerrado o en otra clase de vasija o cámara. Es importante que la atmósfera de este resinto cerrado esté saturada con los vapores de agua y del disolvente orgánico. Se han obtenido excelentes resultados con completa separación de todos los aminoácidos cuando la cromatografía fué llevada a cabo bajo condiciones de trabajo rigurosamente controladas.

En cromatografía de papel ascendente, el papel se suspende desde la parte de arriba y su extremo inferior se sumerge en un recipiente que contiene la mezcla de disolventes. Las tiras de papel grandes se pueden enrollar en forma de un cilindro para que se puedan introducir en la mezcla de disolventes sin necesidad de que tengan que estar suspendidas. En la cromatografía de papel descendente la parte superior de la tira o de la hoja de papel se sumerge en una vasija que contiene la mezcla de disolventes, la cual fluirá hacia la parte de abajo, (Fig 3.3).

Se puede conseguir una resolución excelente y rápida por medio de la cromatografía en capa delgada sobre varios geles cuando se aplica a varios aminoácidos. En este método la

mezcla de aminoácidos se coloca sobre placas de vidrio que han sido cubiertas por medio de una capa homogénea del gel de sílice o de hidróxido de aluminio. La resolución se alcanza en unos 30 - 100 minutos en cromatografía ascendente.

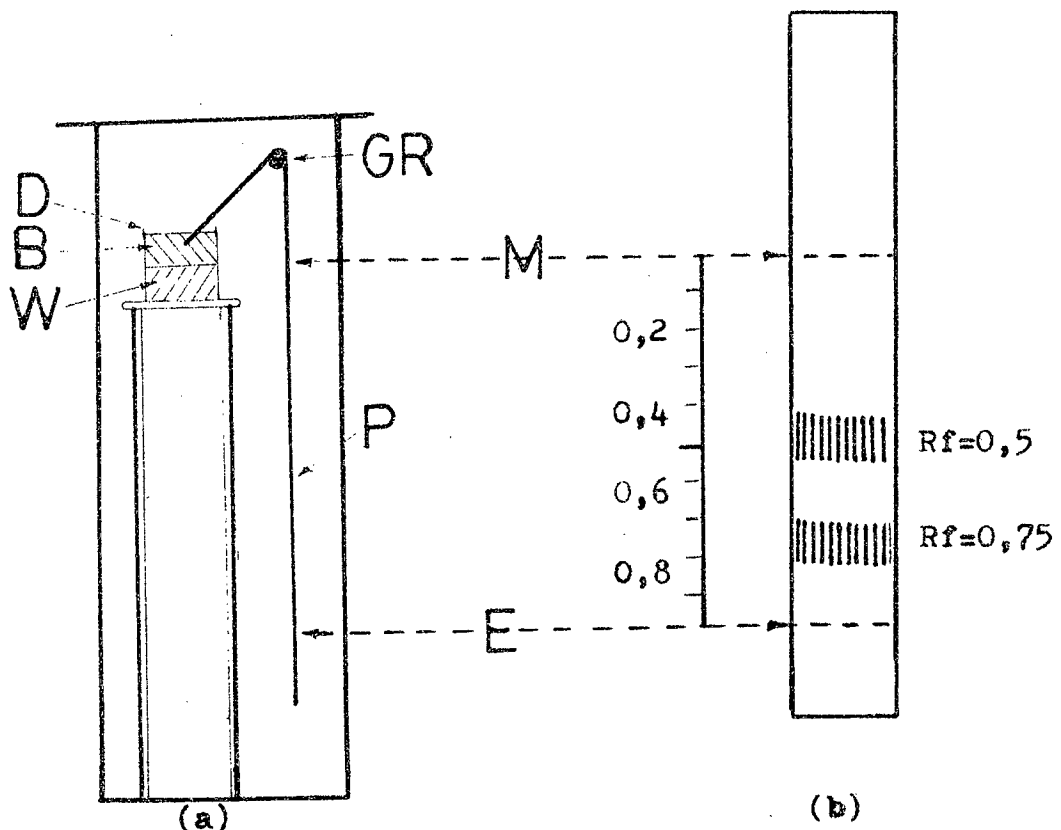


Fig. 3.3. Cromatografía de papel descendente D: vasija; W: agua; B: butanol; M: mezcla de aminoácidos al principio de la emigración; P: papel; E: frente del solvente; GR: varilla de vidrio. Gráfico tomado de: "Biochemistry, an Introductory Text book, Wiley, New York, 1955, p. 70.

Para fraccionar mayores cantidades de aminoácidos se usan columnas de almidón, gel de sílice o resina de intercambio iónico. Puesto que es diferente la distribución de los aminoácidos entre la fase móvil y la fase estacionaria se pueden levigar en diferente grado. Se pueden separar así unos de otros. Si se usan como soporte papel de filtro o placas de capa delgada se puede conseguir un fraccionamiento posterior volviendo el soporte en un ángulo de 90 grados y sometiendo el conjunto al proceso cromatográfico con un segundo

sistema de disolventes. De esta forma la mezcla de aminoácidos se puede resolver en una serie de manchas que se pueden hacer visibles por medio de un tratamiento con nihindrina, - como se muestra en la fig. 3.4.

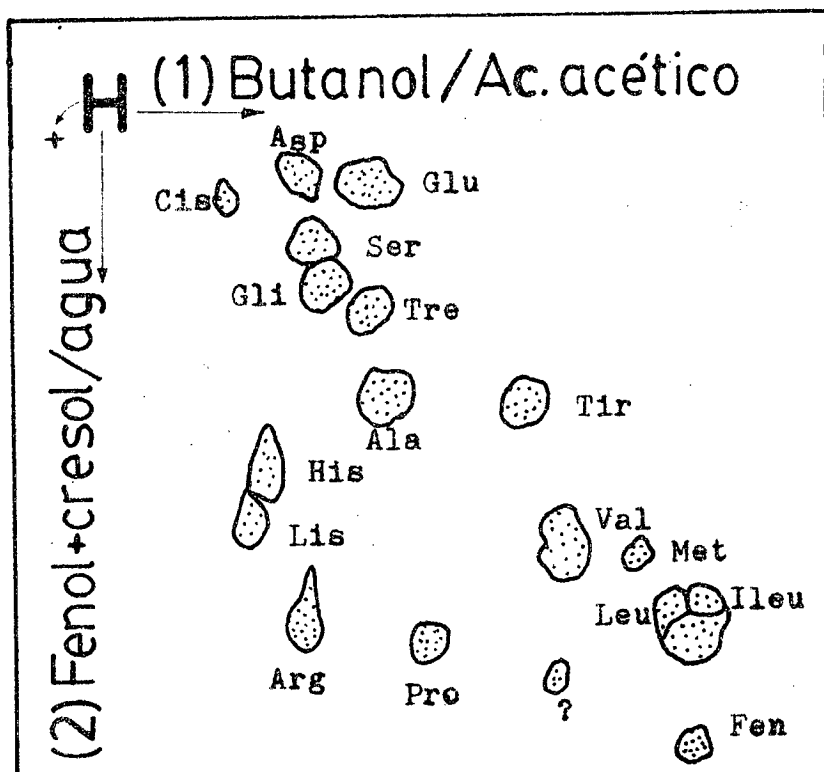


Fig 3.4. Cromatografía de papel de un hidrolizado de proteínas. El hidrolizado fué colocado en el punto marcado con una H y se procedió a estudiarlo primeramente con una mezcla de ácido acético al 10 % y butanol; luego se cambió el papel en un ángulo de 90 grados y se trabajó con una mezcla de fenol más cresol y agua. Los aminoácidos hechos visibles mediante pulverización con nihindrina se indican con las tres primeras letras de sus nombres, excepto isoleucina. Gráfico tomado de "Biochemistry, an Introductory textbook", Wiley, - New York, 1955, p. 135.

Cada una de estas manchas está formada por lo general por un solo aminoácido, con lo que se consigue por este método la separación de casi todos los aminoácidos.

La velocidad de emigración V_a de un aminoácido en un sistema de disolventes dado depende de V_s , que es la velocidad de flujo de la mezcla de disolventes. La relación V_a/V_s

es una constante típica para cada uno de los aminoácidos. Esta relación ha sido representada por el símbolo Rf (relación de velocidades de flujo). Para determinar el valor de Rf en un aminoácido se mide d_a , que es la distancia de emigración del aminoácido y se divide ese valor por d_s , que es la distancia entre el origen y el frente de la mezcla de disolventes - fig 3.3. La relación d_a/d_s es igual a Rf. Naturalmente Rf es siempre menor que la unidad, puesto que los aminoácidos no pueden emigrar más allá del frente del líquido. Se debe poner especial cuidado en hacer la medida antes que el frente del líquido alcance el final del papel, puesto que esta circunstancia haría totalmente imposible la determinación de la distancia existente entre el origen y el frente del disolvente.

Después del descubrimiento del gran poder resolvente de la cromatografía de papel se han utilizado un gran número de sistemas de disolventes utilizando dos o más componentes a fin de incrementar la resolución de las mezclas de aminoácidos.

La invisibilidad de los aminoácidos en el papel sin tratar constituye una desventaja común a todos estos métodos. Si se hacen visibles con ninhidrina sufren descarboxilación. Se han hecho algunos intentos para usar derivados coloreados de los aminoácidos a fin de que su emigración pueda seguirse con la vista durante la cromatografía.⁶

CAPITULO IV

RECOMENDACIONES EN EL USO

Los subproductos del faenado de broiler, tales como -- las plumas, picos, uñas y piel de los tarsos, en nuestro medio tienen usos distintos a los que se les debería dar con afán de aprovechar mejor su rico contenido protéico y poder energético así por ejemplo en caso cuando no son desechados se arrojan a los campos para fertilizar los terrenos. En esta forma se pierde una fuente productora de ingredientes alimenticios especialmente para los animales, porque hemos constatado que los productos en estudio, poseen altos contenidos en aminoácidos como valina, treonina, alamina y sobre todo aminoácidos sulfurados como la metionina, cistina y cisteína; estos últimos en mayores porcentajes porque son los que forman la proteína dura o queratina.

Los estudios hasta ahora realizados únicamente se han dirigido a los diferentes análisis de las plumas pero se puede formar una masa de plumas, piel de los tarsos, uñas y picos, que también contienen elevados porcentajes de substancias protéicas. Si consideramos valores cuantitativos de cada uno de ellos tendremos que aceptar que la producción de plumas en el faenado está en mayor proporción que los demás.

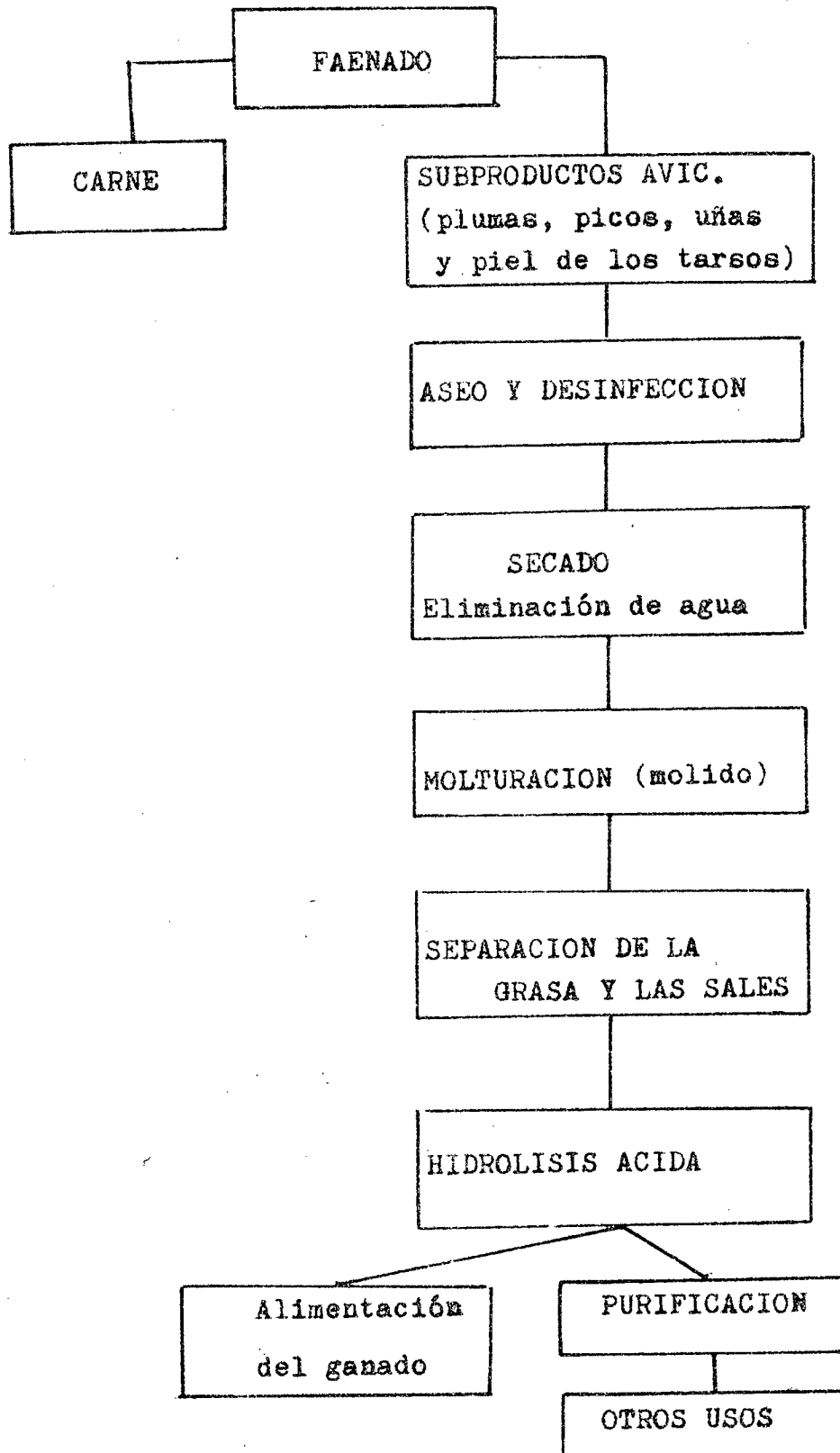
Para que estos productos se usen en la alimentación del ganado deben considerarse algunos factores negativos y positivos. Por un lado son elementos con alto contenido de proteína y valor energético; pero la proteína que entra en su composición, en la mayor parte es queratinizada o dura que resultaría difícilmente digerible para los organismos animales; otro factor es precisamente la apeticibilidad de los animales para tales ingredientes, pues la grasa que posee le da un olor característico que hace que los animales no gusten tales productos.

de origen avícola. Desde estos puntos de vista estos productos deben utilizarse como complementos alimenticios pero en proporciones inferiores a otros ingredientes más apetecibles como el maíz, trigo, etc. o más bien como suplemento alimenticio aportador de proteína; en estas últimas condiciones, dichos productos deben ser sometidos a procesos de separación de sustancias no protéicas, hidrolizado, y si fuera posible una purificación, en caso de querer aportar cierto aminoácido en especial. El primer aspecto, o sea la separación de sustancias no protéicas vale mencionar por ejemplo el desengrasado, que hará un producto carente de ese olor característico y colaborará a la conservación del producto; la hidrólisis es el proceso que transforma las diferentes proteínas en aminoácidos y polipéptidos y en estos estados resulta más benéfico el uso porque el organismo animal asimilará el nuevo producto. La purificación es un proceso más complejo de realizar y por otra parte estaría por demás realizarlo si el producto va destinado a la alimentación del ganado. Este proceso sería de aplicarlo cuando se trate de obtener un concentrado de ciertos aminoácidos en particular y cuando el producto esté destinado a usos más estrictos.

Los diferentes procesos a los cuales deben ser sometidos, hacen que se trate finalmente de un producto relativamente caro y su utilidad se limitaría únicamente a suplemento alimenticio al igual que otros productos comerciales.

La utilidad de subproductos avícolas hidrolizados también haría factible la utilidad de algunos ingredientes más económicos en la formulación de las raciones, por ejemplo limitará la cantidad de maíz, soya, etc.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE LAS PLUMAS, PICOS,
UÑAS Y PIEL DE LOS TARSOS



Para acondicionar los subproductos avícolas para el uso se deben cumplir el diagrama de flujo anterior, en el cual: -- después del faenado de broilers se obtiene como producto principal la carne que va directamente a la alimentación humana, -- y como subproductos se obtienen lógicamente las plumas, uñas -- picos y piel de los tarsos; tales subproductos deben ser sometidos a un aseo y desinfección además de el que se produce en el pelado mecánico (con agua hirviendo), para evitar contagios de posibles enfermedades; luego del aseo con abundante agua -- deben secarse para que eliminando el agua se facilite la próxima etapa que es la molturación en molinos especiales, por cuanto se trata de materiales livianos y voluminosos; el paso siguiente es la eliminación de grasa y secundariamente las sales utilizando en el primer caso refrigerantes y en el segundo con un proceso de diálisis. En estas condiciones la substancia está lista para ser hidrolizada, preferentemente con medios ácidos orgánicos o inorgánicos; y puede ser utilizada para la alimentación del ganado y aves. Cuando el producto requiere de mayor pureza especialmente cuando se destinará para otras utilidades, se someterá a purificación, es decir a obtenerse concentrados ricos en ciertos aminoácidos en particular.

4.1. FORMULACION DE RACIONES.

Como ya se mencionó anteriormente, los subproductos del faenado de broilers después de cierto proceso de acondicionamiento pueden ser utilizados para la formulación de raciones alimenticias para el ganado y aves. Estos materiales se usarán especialmente en los centros industriales de aves, es decir en lugares donde se produzca esta clase de materia prima. En la alimentación misma se aportará a los animales substancias pro-

téicas, minerales como el calcio y el fósforo y algunas vitaminas en pequeñas cantidades.

4.1.1. PARA GANADERIA MAYOR. El ganado vacuno es precisamente la clase animal que puede recibir esta clase de alimento y todo aquel que su alimentación esté racionada. El ganado caballar únicamente si su función es la de competir y su alimentación también tiene que ser racionada y formulada.

El ganado mayor (vacunos) tanto el lechero como el productor de carne tiene basada su alimentación en ensilajes, alfalfa, melaza, harina de soya, urea, sal, fosfato dicálcico; y estos animales necesitan aproximadamente 160 gramos de proteína por kilogramo y así mismo un total de 1800 Kcal por Kg del total de materia seca consumida. Es importante agregar que la base de la alimentación del ganado es sin lugar a dudas el agua. Los vacunos beben de 3 a 4 Kg de agua por cada Kg de materia seca; las vacas lecheras de 3 a 4 Kg de agua por cada Kg de leche producida.¹⁴

Una ración (sobre una base libre de humedad) que contenga un 30 % de heno de alfalfa y un 10 % de ensilaje de maíz deberá proporcionar la cantidad mínima de fibra que necesitan las vacas muy productoras. El porcentaje de cada ingrediente de la ración deberá reunir ciertas condiciones: ser apetecible, tener un costo proporcionado y que cada uno de los ingredientes sea imprescindible para satisfacer una necesidad específica.¹⁴

En tal razón puede incluirse un 25 % de grano de sorgo 3 % de melaza, 0,6 % de urea, 0,5 % de sal y 0,4 % de fosfato

dicálcico. Los otros ingredientes como son la harina de soya grano de maíz y subproductos avícolas hidrolizados pueden utilizarse para completar las necesidades de proteína y energía. El último ingrediente deberá estar en menor proporción que el maíz y soya respectivamente.

En la siguiente fórmula propia para ganado productor - de leche, incluimos el hidrolizado a manera de suplemento y - que aporta específicamente proteína y energía.

Materia seca

Cantidad en un Kg de ración

Ingrediente	Cantidad (g)	Proteína (g)	E.N. (Kcal)	Porcentaje (%)
Alfalfa heno	300	51,3	384	31
Ensilaje (maíz)	100	8,4	170	10,3
Sorgo (grano)	255	31,9	546	26,3
Melaza (caña azúc)	31	1,3	73	3,2
Urea	6	16,9	-	0,6
Sal	6	-	-	0,6
Fosfato dibásico de calcio	4	-	-	0,4
SUBTOTAL	702	109,8	1173	72,4
Maíz dentado	211	21,1	510	21,8
Soya (semillas)	49	23,86	108,29	5,06
Subp. Avic. Hidroliz.	6	4,48	14,52	0,6
TOTAL	968	159,24	1805,81	99,86

Como podemos apreciar la formulación anterior abastece

las necesidades de los animales (160 g/kg de proteína y 1.800 Kcal/Kg), valores ante los cuales debe guiarse el formulador de raciones para evitar problemas especialmente de costos.

4.1.2. PARA GANADERIA MENOR.

El ganado menor que está dependiendo de una alimentación racionada, son especialmente las aves. Modernamente hoy existen sistemas de formulación de raciones basados en computación. Las aves exigen raciones con ingredientes de gran apetecibilidad como por ejemplo el maíz, trigo y alfalfa; de acuerdo a sus exigencias nutritivas y función que desempeñen. Se acostumbra incluir en raciones para aves una serie de alimentos suplementarios con nombres comerciales que aportan especialmente minerales, vitaminas y algunos aminoácidos, entre ellos la metionina, cistina y lisina.

Si en una fórmula para aves incluimos los hidrolizados de subproductos avícolas en la proporción de un alimento suplementario, necesariamente estamos aportando a la ración cantidades considerables de los aminoácidos antes mencionados, algo de calcio y fósforo y lógicamente energía, puesto que se trata de un ingrediente con un poder energético alto al igual de otros como por ejemplo el maíz.

Al utilizar los hidrolizados de subproductos avícolas- aportaríamos a la ración alta cantidad de proteína, esto significaría la rebaja de la cantidad de ciertos ingredientes proteicos de alto costo (maíz, soya) y el aumento de ingredientes más baratos (polvillo de arroz).

En los países desarrollados, donde existen centros industriales avícolas, se utilizan los hidrolizados alimenticios

Ejemplo de fórmula para broilers en primera edad.

Necesidades:

Proteína23 %

Energía.....3200 Kcal/kg.

Ingrediente	Cantidad (kg)	Proteína (%)	Energía (Kcal)
Maíz (amarillo)	56,2	4,94	1.988,6
Alfalfa (desh.)	2	0,30	31,7
Grasa animal	2	-	345,6
Soya	29,7	13,6	667,9
Pezcado anchoa	2	1,32	58,0
Subp. Avic. Hidroliz.	4	3	96,92
Fosfato bicálcico	1,8	-	-
Carbonato	1	-	-
sal	0,3	-	-
Metionina D.L.	0,145	-	-
TOTAL	99,145	23,16	3.188,72

La fórmula anterior abastece las necesidades de proteína y energía necesarios para aves en primera edad. Debemos anotar que también aportan a las aves elementos como:

Lisina.....1.65 %

Metionina.....0,526 %

Met + Cistina.....0,799 %

Calcio.....0,993 %

Fósforo.....0,53 %

Los hidrolizados de subproductos avícolas se incluyen en un $\frac{1}{4}$ % del total y aporta a la fórmula todos los elementos inclusive minerales (Ca y P.). Por tales condiciones es recomendable su uso como alimento también para aves.

4.2. USO COMO COMPLEMENTO.

Por los distintos factores tanto positivos como negativos que presenta el uso de los hidrolizados de subproductos avícolas, consideramos que para el uso debió acondicionarse mediante un hidrolizado, proceso mediante el cual se convierte en un ingrediente con el 75 % de proteína digerible y con un costo elevado en relación a otros ingredientes.

La cantidad de hidrolizado en una ración sería limitada primeramente por el factor costo y luego por la complejidad del proceso de acondicionamiento, tomando en cuenta también que un alto porcentaje de producto afectaría sobre la apetecibilidad.

4.3. USO COMO SUPLEMENTO.

Nuestra conclusión final y recomendación para los productos alimenticios del presente trabajo investigativo, es precisamente el uso como alimento para animales cuya alimentación esté racionada. Pero por tratarse de un producto con alto contenido protéico exigiría ciertas condiciones ambientales para su conservación. Otro factor a considerarse es que los hidrolizados se convertirían más bien en sustancias concentradas de aminoácidos y la utilidad por lo tanto sería como suplemento alimenticio abastecedor de aminoácidos. Todos los suplementos alimenticios e en la mayoría son productos comerciales que aportan ciertos elementos en especial para las necesidades de los animales. El hidrolizado, similarmente podría considerarse al igual que dichos productos.

CUADRO No 1.*

COMPOSICION DE LA HARINA DE PLUMAS HIDROLIZADA
(%)

MATERIA SECA	
Humedad	6,46
Materia seca	93,54
Proteina	82,08
Grasa	3,68
Estracto no nitrogenado	2,02
Cenizas	3,80
Fibra	1,96

Nutrientes digestibles	
totales	73,19

* Cuadro de valores tomado de los análisis experimentados en la Universidad Nacional Agraria "la Molina" Lima-Perú en 1979.

CUADRO No 2.*

COMPOSICION QUIMICA DE LA HARINA DE PLUMAS EN
ESTADO NATURAL (%).**

Humedad	8,82
Materia seca	91,18
Cenizas	2,96
Proteinas	80,69
Azufre	0,336

CUADRO No 3.*

COMPOSICION QUIMICA DE LA HARINA DE PICOS Y UÑAS
(%)

	Picos	Uñas
Humedad	8,78	8,06
Materia seca	91,22	91,94
Cenizas	3,23	3,96
Proteinas	33,12	81,12
Azufre	0,2054	0,2909

* Datos obtenidos de las experiencias realizadas en los laboratorios de la U.T.P.L.

** Los valores en estado natural, se refieren a muestras de harinas sin hidrolizar. Para análisis como Cenizas, proteínas y azufre es necesario un previo desengrasado.

CUADRO No 4.*

COMPOSICION QUIMICA DE LA HARINA DE PIEL DE
LOS TARSOS (%).

Humedad	9,02
Materia seca	90,98
Cenizas	2,84
Proteínas	52,33
Azufre	0,4722

* Datos obtenidos en las experiencias realizadas en los laboratorios de la U.T.P.L.

CUADRO No 5.*

COMPOSICION DE LA HARINA DE PLUMAS HIDROLIZADA

(%)

Humedad	6.8
Cenizas	3.7
Proteína B.	85
Grasa B.	2.5
Fibra B.	1.5
E.M.(Kcal)	2280
Acido linoleico	-
Calcio	0.20
P. Total	0.75
P. disponible	0.75

* Valores tomados del folleto "Formulación Práctica de raciones" publicado por la Real Escuela de Avicultura de España.

CUADRO No 6.*

COMPOSICIÓN EN AMINOACIDOS DE LA HARINA DE PLUMAS
HIDROLIZADA (%)

Arginina	3,92
Fenilalanina	2,66
Fenilalanina + tirosina	4,34
Glicina	4,76
Histidina	0,28
Isoleucina	2,66
Leucina	4,62
Lisina	1,05
Metionina	0,35
Metionina + Cistina	2,35
Treonina	2,80
Triptófano	0,40
Valina	4,55

*Valores tomados del folleto "Formulación Práctica de raciones" publicado por la Real Escuela de Avicultura de España.

CUADRO No 7.*

COMPOSICION DE LA HARINA DE SUBPRODUCTOS AVICOLAS
HIDROLIZADOS (%).

Humedad	6.0
Cenizas	15,6
Proteína B.	93,0
Grasa B.	14,7
Fibra B.	2,6
E.M. (Kcal)	3.000
Acido linoleico	2,2
Calcio	3,29
P. total	0,76
P disponible	0,76

*Valores tomados del folleto "Formulación Práctica de raciones" publicado por la Real Escuela de Avicultura" de España.

CUADRO No 8.*

COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA HARINA DE SUBPRODUCTOS AVICOLAS (%)

Arginina	3,91
Fenilalanina	1,82
Fenilalanina + Tirosina	2,34
Glicina	2,98
Histidina	0,78
Isoleucina	0,62
Leucina	7,60
Lisina	4,50
Metionina	0,65
Metionina + Cistina	1,65
Treonina	2,47
Triptófano	0,72
Valina	5,20

*Valores tomados del folleto "Formulación Práctica de Raciones" publicado por la Real Escuela de Avicultura de España.

CUADRO No 9.*

COMPOSICION DE LA HARINA DE PLUMAS HIDROLIZADA EN
FORMA NATURAL EN AMINOACIDOS, PROTEINA, ENERGIA,-
MINERALES Y VITAMINAS.



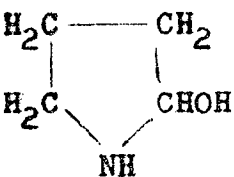
Energia	2423 Kcal/Kg
Proteína B	87,4 %
Proteína D.	75,0 %
AMINOACIDOS:	
(%)	
Arginina	5,9
Cistina	3,0
Glicina	6,80
Lisina	2,0
Metionina	0,60
Triptófano	0,50
MINERALES:	
(%)	
Calcio	0,20
Fósforo	0,80
VITAMINAS:	
(mg/Kg)	
Colina	882
Niacina	30,9
Acido Pantoténico	11,0
Riboflavina	2,2

* Valores tomados del folleto "Necesidades Nutritivas de las aves de corral" publicado por la Comisión de Nutrición Animal, Subcomisión para aves. EE.UU.



CUADRO No 10.*

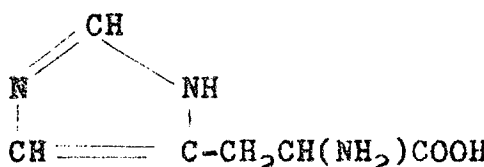
AMINOACIDOS AISLADOS DE LAS PROTEINAS.

Nombre	Fórmula	Símbolo	Punto Iso eléctrico
Glicina	$\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Gli	5,97
Alanina	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Ala	6,00
Serina	$\text{HO}-\text{CH}_2\text{OH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Ser	5,68
Cisteína	$\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Cish	5,05
Cistina	$[-\text{SCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}]_2$	Cissci	4,8
Treonina	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Tre	6,16
Valina	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Val	5,96
Metionina	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Met	5,74
Leucina	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Leu	5,98
Iso-leucina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Ileu	6,02
Fenil-alanina	 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Fen	5,48
Tirosina	 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Tir	5,66
Prolina		Pro	6,30

AMINOACIDOS ACIDOS:

Ac. aspártico	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Asp	2,77
Ac. glutámico	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Glu	3,22

AMINOACIDOS BASICOS:

Arginina	$\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Arg	10,76
Lisina	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	Lis	9,74
Histidina		His	7,59

*Tomado de G. Devore "QUIMICA ORGANICA"

ANEXO No 1.

DETERMINACION DE LA HUMEDAD.

"Se entiende por humedad, la pérdida de peso que experimenta una substancia cuando se somete a desecación en la estufa de aire a la temperatura de 100-105 grados centígrados hasta peso constante."₁

MATERIALES:

1. Cápsulas de porcelana.
2. Estufa de aire.
3. Balanza analítica
4. Desecador.

PROCEDIMIENTO:

Para determinar la humedad se dispone de una cápsula - completamente limpia y seca, que se haya pesado previamente, - poniendo en ella una muestra de alrededor de unos 5 gramos y - pesando nuevamente para ver el peso exacto de la muestra. Se deja en la estufa unas 5 - 6 horas después se lleva al desecador para enfriar durante una hora y poder pesar de nuevo; repitiendo la operación tantas veces como sea necesario hasta - obtener un peso constante. En el desecador se habrá puesto - cloruro cálcico para absorber la humedad del ambiente.

En la práctica se puede tener la cápsula con muestra - en la estufa durante 24 horas, bastando entonces una sola pesada.

DETERMINACION:

HUMEDAD DE LA HARINA DE PLUMAS.

-
1. Real Escuela de Avicultura, "ANALISIS DE PIENSOS", p. 157.

Peso de la cápsula vacía.....52,33 gr.
Peso de la cápsula + muestra..... 55,56 gr.
MUESTRA..... 3,23 gr.

Peso después del proceso..... 55,275 gr.
Humedad de la muestra..... 0,875 gr.
Porcentaje..... 8,82 %

Anexo No 2.

DETERMINACION DE CENIZAS.

"Se entiende por cenizas el residuo que queda después de calcinar la substancia hasta peso constante. Las cenizas están constituidas por óxidos, carbonatos, fosfatos y sulfatos minerales.²

MATERIALES:

1. Crisol de porcelana
2. Pinzas de crisol
3. Horno o mufla
4. Desecador.
5. pipetas
6. Balanza analítica

SOLUCIONES:

1. Agua oxigenada.

PROCEDIMIENTO.

Aunque la calcinación del producto puede hacerse a llama, es mucho más exacto y ahorra mucho trabajo al utilizar un horno o mufla, que dispondrá de regulación automática de temperatura.

El primer paso consiste en disponer de un crisol de porcelana, previamente mantenido en la estufa de desecación a 100 grado C. Una vez frío y tarado, se coloca en su interior una muestra de unos 5 gramos, se pesa con exactitud y se lleva a la mufla por espacio de 3 horas.

2. Real Escuela de Avicultura, "ANALISIS DE PIENSOS", p. 158.

El horno debe ir adquiriendo temperatura lentamente - hasta llegar a unos 500 - 550 grados C., como máximo, regulándose en la práctica entre este punto y 400 grados C. La calcinación se considera terminada cuando el contenido del crisol es un polvo gris o blanco uniforme y sin puntos carbonosos. - Para apresurar el procedimiento se puede agregar 1 ml de agua oxigenada cada 15 minutos.

Una vez frío el crisol se pesa con exactitud y el cálculo de cenizas se deduce del aumento de peso que ha experimentado el crisol.

Para comprobar si la calcinación ha sido total, aunque cabe la apreciación visual, lo más exacto es volver a introducir el crisol en la mufla y repetir las operaciones tantas veces como sea necesario hasta peso constante.

Si el producto a calcinar es rico en cloruro sódico - (harinas de pezgado) conviene calentar la muestra hasta unos 150 grados en la mufla y luego adicionar unas gotas de ácido-sulfúrico habiendo enfriado previamente el crisol. Ello tiene por objeto la formación de sulfato sódico por la acción - del ácido sobre el cloruro sódico, con lo que se evitan los errores. La calcinación se continúa como de costumbre pero - al final una vez pesada, el peso de las cenizas sulfatadas debe multiplicarse por el factor de corrección 0,9 para obtener las cenizas verdaderas.7

CENIZAS EN LA HARINA DE PLUMAS.

Peso del crisol.....	31,36 gr.
Muestra.....	5,0 gr.
peso después de la calcinación	31,508 gr
Cenizas en la muestra.....	0,148 gr (2,96 %).

ANEXO No 3.

DETERMINACION DE PROTEINAS

"Se entiende por proteína bruta la cantidad de nitrógeno de un alimento determinado, calculado por la técnica KJELDAHL y multiplicado por 6,25 dado que la proporción media en que el N forma parte de las proteínas viene a ser el 16 % ($100/16 = 6,25$).₃

MATERIALES:

1. Equipo Kjeldahl (mineralizador, Equipo de destilación)
2. Matraces.
3. Pipetas.
4. Buretas.
5. probetas
6. Erlenmeyers.

SOLUCIONES:

1. Catalizador. (Se)
2. Acido sulfúrico concentrado
3. Acido sulfúrico 0,1 N
4. Hidróxido de sodio 0,1 N
5. Indicador (fenolftaleína)
6. Indicador (rojo de metilo)
7. Agua destilada.
8. Hidróxido de sodio al 50 %.

FUNDAMENTO.

El método se basa en la mineralización de N. orgánico con lo que el N forma amoníaco, el cual, en presencia abundante de ácido sulfúrico pasa a sulfato amónico, desprendiéndose

al mismo tiempo vapores de anhídrido sulfuroso. Al terminar la primera parte del método o mineralización, todo el N orgánico se ha transformado en sulfato amónico.⁷

En la segunda parte o destilación, al hervir el sulfato amónico en un medio alcalino (NaOH) se desprende N que en combinación con el H se forma amoníaco. Este amoníaco destilado se recoge en un vaso en presencia de ácido sulfúrico, volviéndose a formar sulfato amónico. El N que se ha recogido en esta solución de ácido sulfúrico, en forma de sulfato amónico lo calculamos valorando el ácido sulfúrico normal libre, ya que como sabemos la cantidad de ácido sulfúrico utilizada, por diferencia tendremos el sulfúrico combinado.

Sabiendo que cada ml de ácido sulfúrico combinado equivale a 0,0014 de N., multiplicando los ml de sulfúrico combinado por este factor, tendremos el N total de la muestra que hemos pesado.⁷

PROCEDIMIENTO.

En un balón Kjeldahl de 250 ml, se agrega unos 5 gramos de muestra cuidando que no quede en las paredes del balón luego se añaden 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y cierta cantidad de catalizador (Se) y se hidroliza por el tiempo necesario hasta que el contenido tome color amarillento verdoso. Luego se enfría y se trasbasa a un balón de 500 ml, al cual también se agrega agua destilada (unos 100 ml) y unas gotas de fenolftaleína para luego agregar NaOH 50 % hasta que vire la solución. Se destila aproximadamente unos 150 ml cuidando que el producto se deposite en un vaso con ácido sulfúrico 0,1 N medido (unos 50 - 100 ml) y unas gotas de rojo de meti-

lo; si el indicador vira durante la destilación se debe agregar más ácido medido. Por último se valora con NaOH 0,1 N.¹⁶

Para llegar al valor cuantitativo de la proteína se debe seguir el siguiente procedimiento:

Fórmula: Cantidad de N = $100(M.F - M'.F') 0,0014$

M = Ml de ácido sulfúrico empleados.

F = Factor de Normalidad del ácido sulfúrico

M' = ml de NaOH 0,1 N empleados en la valoración

F' = Factor de normalidad del NaOH 0,1 N.

$$\% \text{ de Proteína} = N.6,25/P$$

N = Cantidad de Nitrógeno

P = peso de la muestra.

PROTEINA EN LA HARINA DE PLUMAS.

M = 200ml

F = 1,017

M' = 19 ml

F' = 0,998

$$N = 100(200.1,017 - 19.0,998) 0,0014$$

$$N = 25,8213$$

$$\% \text{ Proteína} = 25,8213.6,25/ 2 \text{ gr.}$$

$$\% \text{ Proteína} = 80,69 \%$$

ANEXO No 4.

DETERMINACION DEL AZUFRE.

MATERIALES.

1. Vaso de precipitación de 250 ml
2. Cocineta
3. Embudo Buchner
4. trampa de agua
5. papel filtro.
6. Estufa.
7. Balanza.

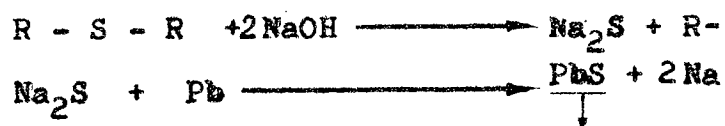
SOLUCIONES.

1. Hidróxido de sodio al 40 %
2. Acetato de plomo al 10 %
3. Agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

1. Se pone una cantidad de muestra pesada a hervir en hidróxido de sodio al 40 %.
2. Después de 10 - 15 minutos de ebullición se agrega unas gotas de acetato de plomo al 10 % y se corta la ebullición después de formado el precipitado.
3. Se filtra en tibio.
4. Se lava con agua destilada tibia el precipitado.
5. Se seca en la estufa, luego se pasa al desecador y se pesa el precipitado. 16

REACCIONES:



DETERMINACION.

Peso del sulfuro de plomo = 239,19 gr.

En 239,19 gr. Hay 32 gr de S
En X (precip) X'

$$X' = \text{Precip. } 32 / 239,19$$

$$\% S = X'.100 / \text{gr de muestra.}$$

CANTIDAD DE AZUFRE EN LA HARINA DE PLUMAS.

Peso de la muestra..... 2 gr
Peso del papel filtro..... 2,254 gr
Peso del papel filtro + precip... 2,3193 gr

Precipitado..... 0,0653 gr

En 239,19 gr de SPb hay 32 gr S
en 0,0653 gr precip. X'

$$X' = 0,0653 \times 32 / 239,19$$

$$X' = 8,736 \cdot 10^{-3} \text{ gr}$$

$$\% S = 8,736 \cdot 10^{-3} \times 100 / 2 \text{ gr}$$

$$S = 0,436 \%$$

ANEXO No 5.

ELIMINACION DE LA GRASA.

"Desde el punto de vista de la alimentación animal se entiende - por grasa bruta el residuo que queda después de desecar a 100°C el extracto total obtenido de un pienso. 4

MATERIALES.

1. Aparato Soxhlet. (matraz, extractor y refrig.)
2. papel filtro.
3. estufa
4. desecador.
5. Cocinetas.

SOLUCIONES.

1. Refrigerante (éter).

PROCEDIMIENTO.

Se introduce la muestra molturada en un cartucho especial de extracción que se tapa con algodón hidrófilo para evitar que salga algo del material, a falta de este cartucho se puede acondicionar uno contruido de papel filtro.

Se introduce el cartucho en el extractor del aparato, - ajustando a continuación las tres piezas y se permite el paso del agua para que funcione el refrigerante cuando se añade el éter.

Por la parte superior del refrigerante se añade el éter hasta que sifone. Después que el éter haya caído al matraz por sifonación, se añade algo más hasta que llene la mitad aproximadamente del extractor. El éter tomará un color amarillento.

Se procede a calentar el éter viéndose como éste se evapora, por hervir a 40 - 45 grados, subiendo los vapores del refrigerante (éter) que luego de condensarse caen en el extractor. Una vez lleno vuelve a sifonar y así sucesivamente por algunas horas hasta que el éter quede incoloro; pudiendo en este momento darse por terminada la extracción. 13

ANEXO No 6.

TECNICA DE HIDROLISIS ACIDA Y ALCALINA.

MATERIALES.

1. Equipos Kitz (balones de tres bocas, calentado
res agitadores y refrigerante)
2. Buretas.
3. pipetas
4. vasos de precipitación.

SOLUCIONES.

1. Acido acético 5 N.
2. Acido clorhídrico 20,5 %
3. Hidróxido de sodio 0,5 N
4. Formaldehído
5. Hidróxido de sodio 2 N.

PROCEDIMIENTO.

Se ponen las muestras en los balones Kitz en un volumen de ácido acético, ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (según el tipo de hidrólisis) y se someten a ebullición por el lapso de 12 a 70 horas. Los agitadores electromagnéticos evitan la formación de espuma durante las primeras etapas especialmente.

A partir de la segunda hora de ebullición se comienza a controlar el proceso en forma volumétrica, que consiste en tomar muestras de 2 ml bien medidos, se agrega unas gotas de fenolftaleína y se valora con NaOH 0,5 N. El proceso será positivo siempre y cuando el consumo de álcali sea cada vez mayor. Una vez que se produce el viraje, se agrega 1 ml de formaldehído y se vuelve a valorar; si el consumo es ascendente, se ha producido estructuras tampón.



BIBLIOGRAFIA.

1. Biddle y Juegerson, "MANUAL DE PRODUCCION AVICOLA", primera edición, Editorial Azteca, México, - 1955.
2. Celsi Iacobucci, "QUIMICA ELEMENTAL MODERNA ORGANICA", primera Edición, Editorial Kapelusz, Buenos-Aires.
3. Comisión de Nutrición Animal, "NECESIDADES NUTRITIVAS DELGANADO VACUNO LECHERO", Washington D.C., 1968, traducción castellana, Editorial - Emisferio Sur, Buenos Aires.
4. COMISION de Nutrición Animal, "NECESIDADES NUTRITIVAS DE * LOS OVINOS", Washington D.C. 1968, Traducción castellana - Editorial hemisferio Sur, - Buenos Aires.
5. Comisión de Nutrición Animal, "NECESIDADES NUTRITIVAS DE - LAS AVES DE CORRAL", Washing ton D.C., 1968, traducción - Castellana, Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
6. Felix Haurowitz, "QUIMICA Y FUNCION DE LAS PROTEINAS", Ediciones Omega S.A., Casanova 220, Barcelona, 1969.
7. Felix Haurowitz, "BIOCHEMISTRY, AN INTRODUCTORY TEXTBOOK", Wily, New York, 1955.

8. G. Devore, "QUIMICA ORGANICA", Traducción y adaptación E.-
Muñoz Mena, Segunda reimpresión en español, Pu-
blicaciones cultural, México D.F., 1974.
9. J.H. Northrop, "CRISTALLINE ENZIMES", New York, Columbia -
Univ., 1948.
10. L. Blas Aritio, S.M. "ATLAS DE ZOOLOGIA", Ediciones Jover
Décimo cuarta edición, 1979.
11. Sociedad Interamericana de prensa, "LA HACIENDA", No 3, -
año 76, Mayo/Junio, -
1981.
12. P. Alexander y R.J.Block, "ANALITICAL METHODS OF PROTEIN*
CHEMISTRY", London, 1961.
13. Real Escuela de Avicultura, "ANALISIS DE PIENSOS", lección
17, Barcelona España, 1960.
14. Real Escuela de Avicultura, "FORMULACION PRACTICA DE RACIO
NES", Lección 15, Barcelona Es
paña, 1960.
15. T.L. Mcmeekin y R. Warner, "ANN.REV BIOCHEM", New York, -
1946.
16. U.T.P.L. "EXPERIENCIAS DE LABORATORIO INTENSIVO", 1977 -
17. U.T.P.L. "INDUSTRIALIZACION DE PRODUCTOS PECUARIOS", Ni--
vel III, Alimentos balanceados, 1977.

INDICE DE GRAFICOS.

Gráfico de la hidrólisis de harina de plumas con ácido-acético.....	22
Gráfico de la hidrólisis de harina de plumas con ácido-clorhídrico.....	23
Gráfico de la hidrólisis de harina de plumas con hidróxi do de sodio.....	25
Gráfico de la hidrólisis de harina de picos con ácido-acético.....	26
Gráfico de la hidrólisis de harina de uñas con ácido - acético.....	27
Gráfico de la hidrólisis de harina de picos con ácido-clorhídrico.....	28
Gráfico de la hidrólisis de harina de uñas con ácido - clorhídrico.....	30
Gráfico de la hidrólisis de harinas de picos y uñas con- hidróxido de sodio.....	31
Gráfico de la hidrólisis de harina de piel de los tarsos, con ácido acético.....	32
Gráfico de la hidrólisis de harina de piel de los tarsos, con ácido clorhídrico.....	33
Gráfico de la hidrólisis de harina de piel de los tarsos, con hidróxido de sodio.....	34

INDICE GENERAL.

Certificación.	ii
Contenido.	iii
Introducción.	vi

CAPITULO I

CONSTITUCION DE LAS PLUMAS Y MATERIAL CORNEO

Características físicas y químicas de las plumas.	2
Humedad.	4
Cenizas, proteínas y azufre.	5
Características físicas y químicas del material córneo... .	6
Pico y uñas.	6
Humedad, cenizas.	7
Proteínas y azufre.	8
Epidermis (piel de los tarsos).	9
Humedad cenizas y proteínas.	9
Azufre.	10

CAPITULO II

HIDROLISIS DE LAS PROTEINAS

Técnicas de hidrolizado de plumas.	21
Hidrólisis ácida.	21
Hidrólisis alcalina	24
Técnicas de hidrolizado del material córneo.	25
pico y uñas	26
Hidrólisis ácida.	26
Hidrólisis alcalina	31
Epidermis (piel de los tarsos).	32
hidrólisis ácida.	32
Hidrólisis alcalina.	34
Interpretación de resultados.	35

Sistemas de control de la hidrólisis.	37
Volumétrica.	37
Otras técnicas.	38
Técnicas aconsejadas.	40

CAPITULO III

TECNICAS DE SEPARACION Y PURIFICACION

Técnicas de separación.	43
Aislamiento de las proteínas a partir de sus disoluciones.	50
Eliminación del agua.	51
Técnicas de purificación.	53

CAPITULO IV

RECOMENDACIONES EN EL USO

Diagrama de flujo del proceso	64
Formulación de raciones.	65
Para ganado mayor.	66
Para ganado menor.	68
Uso como complemento.	70
Uso como suplemento	70
Cuadros.	71
Anexos.	80
Bibliografía.	92