

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LA METAMIOGLOBINA Y SU RELACIÓN CON LOS
CAMBIOS DE COLOR EN EL MÚSCULO DE COCHITO (*Balistes
polylepis*) DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN HIELO**

POR

GABRIEL JOSÉ FUENTE GÓMEZ

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN
ANIMAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

ENERO DE 2012

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Gabriel José Fuente Gómez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.




Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director de tesis



M.C. María Elena Lugo Sánchez

Comité



Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez

Comité

Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera

Comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar crédito al C.I.A.D., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco Aguilar', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Agradezco a mi comité de tesis: Dr. Ramón Pacheco Aguilar, a la M.C. María Elena Lugo Sánchez, al Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez, al Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera.

Al magnífico laboratorio en el que tuve el honor de poder trabajar, el cual está formado por un excelente grupo de trabajo y de mis amigos: gracias a las M.C. María Elena, M.C. Guillermina, M.C. Gisela, Dr. Juan Carlos, Dra. Susana, Dra. Tere, Dra. Celia, Marcel, Ana Gloria, Angélica, Aarón, Carlos, Aristeo, Marco Antonio, Mariel, Julio, Josué, Dolores, Wendy, Nayeli.

Agradezco de una manera muy especial a la M.C. María Elena Lugo, M.C. Guillermina García, M.C. Gisela Carvallo, Dr. Rogerio Sotelo, M.C. Ana Gloria Villalba, M.C. Emmanuel Aispuro Hernández, M.C. Irlanda Lagarda Díaz, M.C. Karina García Orozco, M.C. Idania Quintero Reyes, Dr. Daniel Olmos Liceaga, M.C. Marisol Ochoa Villarreal por su apoyo técnico y múltiples asesorías.

A mis amigos Gabriel, Jorge, Eli, Carlos, Emma, Citlali, Johana, Panchita, Hayati, Gaby, Erika, Susy, Anita, Karina, Vianey, Melissa, Marissa, Neybi, Olga, Nayeli, Nidia, Vanesa, Cindy, Violeta, Carlos A. y Carlos J., Karen, Irlanda, Marisol e Idania y muy especialmente a mi compañera de tan hermosos momentos, Faby. A los maitros y amigos Julio, Many, Aldo, Alberto, Orlando, Pepe y compañeros de maestría.

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a las personas que más admiro y amo en la vida, mi familia. A mis papás, María Teresa Gómez González y Manuel Fuente Franco. Definitivamente pienso que todas las palabras para expresarles mi amor serian poco comparado con todo lo que siento por ustedes. Pero, si eligiera algunas de estas palabras, serian para agradecerles eternamente y decirles mil veces que los amo y para que sean una prueba de mi gratitud ante todos sus esfuerzos por ayudarme a ser quien soy, cumplir mis metas y ser muy feliz.

A mis hermanos Manolo, Jessica y Mayra porqué parte de este trabajo está basado en los esfuerzos que todos como familia hemos dado para poder salir adelante. A mis hermosos sobrinos, Manolito y miniJesy por ser una alegría más en mi vida y por hacerles la vida feliz a mis papás y a toda la casa. ¡Gracias a todos ustedes!

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Panorama de la Situación de la Pesca en el Mundo	3
El Cochito (<i>Balistes polylepis</i>).....	5
Bioquímica de los Cambios de Color en el Músculo de Pescado	6
Carotenoides.....	7
Mioglobina	7
Factores que Afectan los Cambios de Color del Músculo.....	10
pH.....	10
Temperatura	12
Metamioglobina Reductasa	13
Presión Parcial del Oxígeno	13
Evaluación Preliminar de los Cambios de Color en el Músculo del Cochito.....	14

Metodología Empleada en la Medición del Color del Músculo	16
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS.....	21
General.....	21
Específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Reactivos	22
Determinación de la Concentración de Proteína	23
Etapa I: Purificación de la Mioglobina del Cochito (<i>Balistes polylepis</i>)	23
Materia Prima.....	23
Extracción y Purificación de Mioglobina del Músculo del Cochito..	24
Análisis de Pureza y Determinación de Peso Molecular de las Fracciones.....	25
Etapa II: Establecimiento de las Ecuaciones Espectrofotométricas para la Determinación de las Formas Redox de la Mioglobina	26
Preparación de las Formas Redox de la Mioglobina.....	26
Espectros de Absorción de las Formas Redox de la Mioglobina ...	27
Cálculo de los Coeficientes de Extinción Molar por la Ley de Lambert-Beer.	27
Desarrollo de Ecuaciones para Cálculo de Concentraciones de las formas Redox de la Mioglobina.....	28

Etapa III: Evaluación de la Ecuación y su Relación con los Cambios de Color Durante el Almacenamiento en Hielo	29
Materia Prima.....	29
Determinación de pH	29
Medición del Color del Músculo	30
Determinación de las Concentraciones de las Formas Redox de la Mb Durante el Almacenamiento	30
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Etapa I: Purificación de la Mioglobina del Cochito (<i>Balistes polylepis</i>)	32
Etapa II: Establecimiento de las Ecuaciones Espectrofotométricas para la Determinación de las Formas Redox de la Mioglobina	36
Espectros de Absorción de los Derivados de Mioglobina de Cochito	36
Cálculo de los Coeficientes de Extinción Molar por la Ley de Lambert-Beer	39
Desarrollo de Ecuaciones para Cálculo de Concentraciones de las Formas Redox de la Mioglobina.....	41
Etapa III: Evaluación de la MetaMb y su Relación con los Cambios de Color en el Músculo de Cochito Durante su Almacenamiento en Hielo	44
Formación de metaMb y su relación con los cambios de color en el músculo del cochito.....	46

CONCLUSIONES 51

BIBLIOGRAFÍA..... 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de purificación de la mioglobina del músculo de cochito.....	35
Tabla 2. Coeficientes de extinción molar (ϵ /mM/cm) a las longitudes de onda de máxima absorción seleccionadas para establecer las ecuaciones (4) y (5) para las tres formas redox de la mioglobina.....	40
Tabla 3. Ecuaciones espectrofotométricas para la determinación de las concentraciones de las formas redox de la mioglobina reportadas en la literatura.	43
Tabla 4. Comparación de las formas redox (%) en extractos acuosos de mioglobina de cochito usando diferentes tipos de las ecuaciones y propuestas en este estudio.	48
Tabla 5. Concentración total de mioglobina en extractos acuosos de mioglobina de cochito por la ecuación propuesta y por el método de ditionito de sodio.	49
Tabla 6. Colorimetría de triestímulo del músculo de cochito almacenado durante 15 días en hielo ($^{\circ}$ C).	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figure 1. Estructura de la mioglobina.	9
Figura 2. Espectro de absorción de una mezcla de las formas redox de la mioglobina.	19
Figure 3. Perfil de elución de mioglobina de músculo cochito usando una columna con Sephadex G-50.	33
Figure 4. Cromatograma de elución de Mb de cochito por intercambio iónico utilizando una columna DEAE FF.	33
Figure 5. Patrón de SDS-PAGE del proceso de purificación de Mb del músculo de cochito.	35
Figure 6. Espectros de absorción de las formas redox de la mioglobina del músculo del cochito en la región de Soret (350-450 nm).	37
Figure 7. Espectros de absorción de las formas redox de la mioglobina del músculo del cochito en la región visible (450-750 nm).	38

ANEXOS

ANEXO 1.....	52
ANEXO 2.....	53
ANEXO 3.....	54

RESUMEN

El cochito (*Balistes polylepis*) es una especie de pescado muy apreciado en el Noroeste de México, debido a la blancura y buen sabor del músculo. Sin embargo, durante su almacenamiento en hielo, su músculo presenta cambios de color que disminuyen su aceptación por parte del consumidor. Se ha descrito que los principales pigmentos responsables de impartir color al músculo de pescado son los carotenoides (i.e., astaxantina) y la mioglobina (Mb). Estudios previos de la especie, demostraron que la concentración de astaxantina no estaba relacionada con los cambios de color del músculo, sugiriéndose que estos cambios pudieran estar asociados a la formación de un pigmento verde ("greening"). Esta reacción es formada cuando la Mb oxidada (MetaMb) reacciona con el óxido de trimetilamina (OTMA) y un residuo de cisteína. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la formación de metaMb y su relación con los cambios de color en el músculo del cochito durante su almacenamiento en hielo. Resultados preliminares en donde se evaluó la concentración de metaMb y de OTMA presentes en el músculo del cochito, mostraron valores por debajo de los niveles sugeridos para que se diera la reacción de "greening". Además, no se dio un incremento de metaMb en el músculo durante su almacenamiento en hielo, lo anterior, al aplicar la metodología de uso de ecuaciones para cuantificar la MetaMb en atún. Este resultado se opone a lo reportado para otras especies de peces, suponiéndose que el uso de las ecuaciones establecidas en la literatura, aplicadas al músculo de cochito, podrían estar arrojando una subestimación en la formación de la metaMb en el mismo. Por ello, se evaluó y adaptó una metodología establecida para el cálculo de la Mb purificada en cochito. Se purificó la Mb del músculo del cochito, obteniéndose los espectros de absorción para las formas redox de la Mb. Las longitudes de onda de máxima absorción se localizaron a los 503 nm

para la MetaMb, 542 nm para la oxiMb y 560 nm para la desoxiMb. Con ellos, se estableció un nuevo conjunto de ecuaciones lineales. Al correlacionar el % de metaMb obtenido de las ecuaciones desarrolladas con los cambios de color obtenidos por colorimetría de triestímulo (L^* , a^* , b^*) se encontró que la correlación no fue significativa ($p > 0.05$). Lo anterior sugiere que los cambios de color en el músculo del cochito durante su almacenamiento en hielo, no pueden ser atribuidos a la formación de metaMb.

INTRODUCCIÓN

El cochito (*Balistes polylepis*) es una especie marina que habita, entre otros, en el Golfo de California. El cochito es muy apreciado en el Noroeste de México por su músculo blanco y buen sabor. Su principal forma de comercialización en el mercado local es en filete fresco-congelado (Pacheco-Aguilar et al., 2003). Sin embargo, durante su almacenamiento en hielo, el músculo del cochito presenta cambios de color que disminuyen la aceptación por parte del consumidor (Puente-Zepeda, 2003).

En la literatura se ha descrito que los principales pigmentos responsables de impartir color al músculo de pescado son los carotenoides (i.e. astaxantina) y a la oxidación de la mioglobina (Mb). Estudios previos de la especie, demostraron que la concentración de astaxantina no estaba relacionada con los cambios de color del músculo, sugiriéndose que estos cambios de color pudieran estar asociados con la formación de un pigmento verde (“greening”). Esta reacción es formada cuando la metaMb reacciona con el óxido de trimetilamina y un residuo de cisteína. Resultados preliminares mostraron valores por debajo de los niveles sugeridos de los reactantes para que se diera la reacción del “greening”. Además, no se dio un incremento en la formación de metaMb en el músculo durante su almacenamiento en hielo. Este resultado se opone a lo reportado para otras especies. Sugiriéndose que la aplicación de la metodología empleada para cuantificar la metaMb podría estar arrojando una subestimación en la cuantificación de la metaMb en el músculo del cochito.

Una manera de evaluar la oxidación de la Mb es mediante el uso de la espectrofotometría visible. Esta técnica permite determinar simultáneamente las concentraciones de los estados reducidos y oxidados (redox) de la Mb, es decir metaMb, oxiMb y desoxiMb, mediante la extracción del pigmento en un extracto

acuoso. Las concentraciones relativas de los derivados redox son calculados a partir de ecuaciones derivadas de la aplicación de la ley de Lambert y Beer (Viriyarattanasak et al., 2011). Tal es el caso de la ecuación de Krzywicki (1982) desarrollada a partir de los espectros de absorción de Mb de caballo. Sin embargo, se encontró que estas ecuaciones generan valores negativos para algunas de las formas redox de la Mb, y que el total de Mb estimada obtenida por la suma de los derivados de la Mb se desvía de la unidad. Aparentemente la selección inadecuada de las longitudes de onda empleadas en el desarrollo de las ecuaciones parecen ser las responsables de este problema (Tang et al., 2004).

Por otro lado, recientemente Viriyarattanasak et al. (2011) demostraron que la aplicación de las ecuaciones de Krzywicki (1982) y Tang (2004) resultó en diferencias en la estimación de los valores del % metaMb de atún, no así para Mb de res. Considerando que las ecuaciones reportadas se derivan de los espectros de absorción de la Mb de caballo, las diferencias en los resultados encontrados en las muestras de atún, se deben a las diferencias entre los espectros de absorción de la Mb de caballo y de atún. Por esta razón, se estableció un nuevo conjunto de ecuaciones a partir de los espectros de absorción de la Mb de atún (Viriyarattanasak et al., 2011).

A pesar de que existen algunas diferencias en los espectros de absorción entre las mioglobinas en función de la especie de pescado (Matsuura y Hashimoto, 1954; Yamaguchi et al., 1979; Chaijan et al., 2007), hasta la fecha no se ha desarrollado una ecuación adecuada derivada de los espectros de absorción del cochito y no existe un estudio que demuestre que la aplicación de las ecuaciones reportadas sean adecuadas para cuantificar la mioglobina del cochito. Por lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la formación de metaMb y su relación con los cambios de color en el músculo del cochito (*Balistes polylepis*) durante su almacenamiento en hielo.

ANTECEDENTES

Panorama de la Situación de la Pesca en el Mundo

En el 2009, la producción mundial de pesca alcanzó los 145 millones de toneladas (90 millones de toneladas de la pesca por captura y 52 millones por acuicultura). De este total, 118 millones de toneladas se destinaron al consumo humano, mientras que las restantes fueron destinadas a otros usos (alimentación de ganado, harina de pescado para la acuicultura) (FAO, 2010).

Los diez principales países productores pesqueros en el 2010 fueron China, Perú, Indonesia, Estados Unidos de América, Japón, India, Chile, Rusia, Filipinas y Myanmar. De estos, China sigue siendo por mucho el líder mundial en producción con 47.5 millones de ton. (32.7 y 14.8 millones de toneladas procedentes de la acuicultura y la pesca de captura, respectivamente) (FAO, 2010). En el caso de México, nuestro país pasó del 30^{avo} lugar en aportación a la captura total mundial, al 17^{avo} durante los últimos veinte años. En la actualidad produce cerca del 1.5 % del volumen total mundial (CONAPESCA, 2008).

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), los mares y océanos del mundo están en riesgo de sufrir un agotamiento de sus poblaciones pesqueras debido a la sobrepesca de especies de importancia comercial. En general, el 80 % de las pesquerías están en algún grado de riesgo por la pesca excesiva. De este porcentaje, 52 % están totalmente explotadas, 19 % sobreexplotadas, 8 % agotadas y solo el 1 % están recuperándose de la sobreexplotación.

Únicamente el 20 % de los recursos pesqueros están moderadamente explotados o infraexplotados, con posibilidades de mayor producción (FAO, 2010).

En México, la pesca sigue el mismo patrón que las tendencias mundiales porque no existe una política clara y estratégica dirigida a la sustentabilidad de las pesquerías comerciales, lo que provoca que exista una sobreexplotación de las especies. Sin embargo, se considera que la actividad pesquera cuenta con potencial de desarrollo debido a la existencia de reservas de recursos subexplotados, con posibilidad de aumentar el volumen de producción y de consumo (OIEDRUS, 2008).

En México, los problemas de sustentabilidad se manifiestan en el esfuerzo pesquero excedido, destrucción o deterioro del hábitat, contaminación y concentración de pocas especies. En este último punto, para Sonora, la producción mantiene una estructura basada en la captura de grandes volúmenes de sardina, calamar y camarón (tanto de captura como de cultivo), representando, en el año del 2008, el 95 % en el total de la captura. El 5 % restante corresponden a las especies de corvina, sierra, chano, cochito, jaiba, manta, tiburón y cazón, entre otras (OIEDRUS, 2008). Ante la situación expuesta sobre el panorama de la pesca mundial, diversas organizaciones convergen en que es necesario aplicar prácticas pesqueras responsables que permitan hacer frente a la problemática (FAO, 2010). Para México, el éxito de sus pesquerías radicará en la aplicación de medidas por parte del gobierno para mitigar los conflictos señalados, aunado a estrategias de diversificación de especies, tal como el cochito, a las tradicionalmente demandadas.

El Cochito (*Balistes polylepis*)

El cochito (*Balistes polylepis*) es un pez que se distingue por su cuerpo comprimido, de piel gruesa, boca pequeña, dientes fuertes y salientes (ocho en cada mandíbula); aleta dorsal con tres espinas y escamas detrás de las aberturas branquiales. Su piel es de color café-olivo a gris azulado con puntos difusos de color azul sobre la nuca y cerca de la parte espinosa de la aleta dorsal. Su longitud máxima puede ser de 80 cm, alimentándose de moluscos, erizos, crustáceos, gusanos y otros organismos del fondo marino. Su temporada de reproducción es durante los meses de julio y agosto (Humann y Deloach, 1994).

El cochito es una especie que habita, entre otros lugares, en el Golfo de California. Su distribución se extiende desde las costas de San Francisco, California (EUA) hasta el sur de Chile. En Baja California Sur su captura se localiza en Bahía Magdalena, Todos Santos, Isla Espíritu Santo, Bahía de La Paz, El Juncalito y Bahía Concepción, mientras que en Sonora, se encuentra en toda su costa (Humann y Deloach, 1994). Esta especie es apreciada por los consumidores del Noroeste de México, por su músculo blanco y buen sabor. Con capturas de apenas 500 toneladas al año, el cochito representa una alternativa para la pesquería mexicana ante la situación de sobreexplotación que actualmente vive el mundo, concentrada en la captura de unas cuantas especies (OIEDRUS, 2008).

Para ampliar sus expectativas de explotación y comercialización, se ha promovido el estudio de sus propiedades bioquímicas postmortem, estableciéndose que la especie en su forma entera tiene una vida útil de almacenamiento en hielo (0 °C) hasta por 20 días (Pacheco-Aguilar et al., 2003). Sin embargo, durante su almacenamiento en hielo en forma de filete, su

músculo presenta cambios de color en los primeros días de almacenamiento, los cuales son considerados por debajo del estándar comercial (Puente, 2003). Debido a que la principal forma de comercialización del cochito es en forma de filete fresco-congelado, el color y la apariencia del músculo son factores importantes que determinarán la aceptación o el rechazo del producto por parte del consumidor. Por consiguiente, es de especial relevancia el identificar las causas que originan los cambios de color en el músculo del cochito, para implementar estrategias que permitan mejorar el manejo de la especie.

Bioquímica de los Cambios de Color en el Músculo de Pescado

Se ha descrito que los principales pigmentos responsables de impartir color al músculo de pescado se agrupan en carotenoides y hemoproteínas (Hui et al., 2004). De las hemoproteínas, tanto la hemoglobina como la mioglobina son las proteínas responsables del color rojo de la sangre y del músculo respectivamente. Sin embargo, se considera que la hemoglobina no contribuye a la apariencia del músculo puesto que esta se pierde durante el desangrado del pez, mientras que la mioglobina queda retenida en la estructura intracelular. También hay algunos sistemas enzimáticos, cuyas coenzimas o grupos prostéticos poseen propiedades cromóforos (peroxidasas, citocromos y flavinas) (Faustman et al. 1996). Sin embargo, su contribución al color del músculo es débil. A continuación, se describen las principales características de los compuestos más importantes que imparten color al músculo.

Carotenoides

Los carotenoides son compuestos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias. Los carotenoides llegan a estar presentes en el tejido animal cuando este incluye en su dieta vegetales ricos en estos pigmentos. En el músculo de pescado pueden ser adquiridos como resultado del consumo de fitoplancton, o bien, al consumir crustáceos pequeños, algas, pequeños peces y otros, que actúan como organismos acumuladores (Simpson, 1982; Steven, 1948). Dentro de los carotenoides las astaxantinas son los que se encuentran en mayor concentración y son los responsables de impartir tonalidades rosáceas al músculo del salmón. Aunque de forma menos abundante, también se pueden encontrar pequeñas cantidades de otros carotenoides como zeaxantina, luteína, capsantina, etcétera (Torrissen et al., 1989).

Mioglobina

La mioglobina es una hemoproteína globular localizada en las fibras musculares cuya función fisiológica es almacenar y transportar oxígeno a los diferentes tejidos (Govindarajan y Snyder, 1973). Su concentración en el músculo está determinada por la especie, alimentación, sexo y edad del animal, así como del tipo de músculo y su actividad física (Chaijan et al., 2005). La mioglobina es el principal pigmento responsable del color del músculo (Chaijan et al., 2007). No obstante, no es el único hemo pigmento presente en el músculo capaz de impartir color. El tetrámero de la mioglobina y pigmento

sanguíneo, la hemoglobina, no influencia en el color del músculo; además se considera que durante el manejo, procesado y almacenamiento de las especies marinas, ésta es eliminada en el desangrado (Faustman y Cassens, 1990), considerándose como mínima su concentración en el músculo comparada con la mioglobina. Los citocromos son hemoproteínas que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas. Aunque se encuentran presentes en el músculo, sus concentraciones son tan pequeñas que es poco probable que influyan directamente en color del músculo (Faustman y Cassens, 1990).

La mioglobina está formada por una sola cadena polipeptídica (denominada globina) que se pliega sobre un grupo prostético, el hemo, el cual contiene el lugar de unión del oxígeno (Figura 1). La porción proteica de la molécula consta de ocho segmentos helicoidales denominados con las letras de la A a la H. El peso molecular de la mioglobina varía entre especies (entre 14 y 18 KDa), siendo las mioglobinas de peces de menor peso que las de mamíferos (Thiansilakul et al., 2011).

El grupo hemo, que proporciona el característico color rojo al músculo y a la sangre, está compuesto por un átomo de hierro, unido por cuatro de sus seis enlaces de coordinación a un componente orgánico, llamado protoporfirina (Figura 1). Este grupo prostético se encuentra sujeto a la globina por la unión entre el quinto sitio de coordinación del hierro y un residuo de histidina proximal. El sexto enlace está disponible para la unión de una variedad de ligandos (Faustman y Cassens, 1990).

En la mioglobina, el átomo de hierro del grupo hemo puede encontrarse en dos formas, como hierro ferroso reducido (2+) o férrico oxidado (3+). Cuando el hierro se encuentra en estado ferroso y ningún ligando está presente en el sexto enlace de coordinación se denomina desoximioglobina. Esto resulta en el típico color rojo púrpura asociado a los productos cárnicos empacados al vacío

y del músculo recién cortado (Renerre, 1990; Mancini y Hunt, 2005). Cuando una molécula de oxígeno ocupa el sexto enlace de coordinación del átomo de hierro ferroso, se denomina oximioglobina, siendo esta forma característica por el desarrollo de un color rojo-cereza brillante. Estas dos formas reducidas de la mioglobina son fácilmente oxidadas al indeseable color café marrón de la metamioglobina, en la que el hierro hemo se modifica al estado férrico, pasando a ocupar una molécula de agua el sexto enlace de coordinación (Faustman y Cassens, 1990).

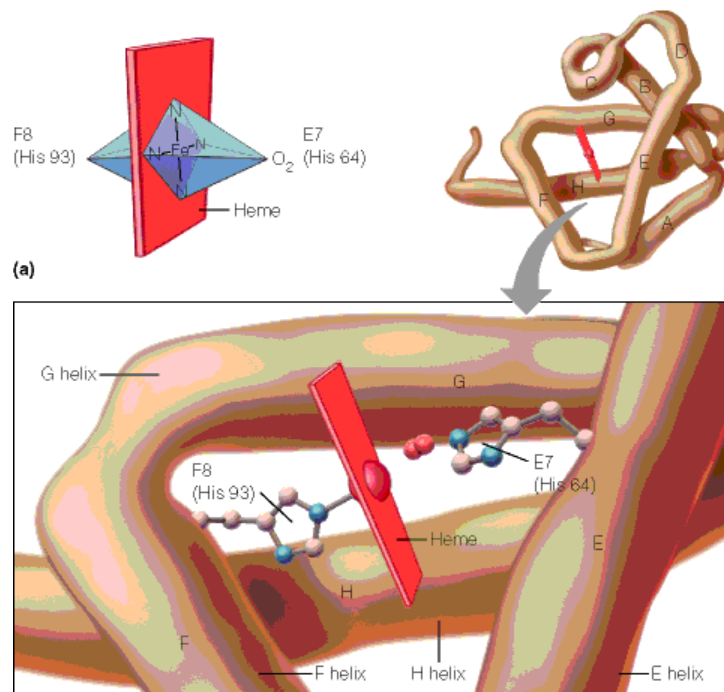


Figure 1. Estructura de la mioglobina.

En resumen, se puede decir que el color del músculo dependerá de la química de la mioglobina, su estado redox y el tipo de ligandos unidos al grupo hemo, así como de su concentración presente en el músculo. Para la industria alimentaria, la acumulación de metaMb en el músculo resulta en un grave problema que limita su comercialización. Este fenómeno puede verse

influenciado por diversos factores como el pH, temperatura, fuerza iónica, presión parcial del oxígeno, que se describen a continuación (Renerre y Labas, 1987; Chaijan et al., 2007).

Factores que Afectan los Cambios de Color del Músculo

Es importante enfatizar que en un sistema complejo como lo es el músculo, ningún factor actúa de manera independiente. Además, al igual que la mayoría de las proteínas del músculo, la mioglobina, está sujeta a los mismos factores que afectan la estabilidad y estructura de las proteínas. En general, la estructura terciaria de las proteínas nativas es mantenida por diversas interacciones: hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, electroestáticas, fuerzas de Van der Waals y enlaces disulfuro. El desequilibrio de estas interacciones por diversos factores, llevará a alteraciones en la estructura (secundaria y terciaria) de las proteínas, generando cambios conformacionales. Considerando que la mayoría de los cambios de color del músculo están involucrados con las alteraciones de la estructura proteica de la mioglobina, el conocimiento de los factores anteriormente mencionados contribuirá en la generación de estrategias que ayuden a contrarrestar los problemas relacionados con los cambios de color del músculo.

pH

El efecto del pH en la estabilidad del color del músculo, estará determinado por el pH final alcanzado por el mismo postmortem y su efecto en

el desequilibrio de los factores que determinan la estabilidad de la mioglobina como lo son las interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, electroestáticas, fuerzas de Van der Waals y enlaces disulfuro (Huss et al., 1998).

Las proteínas globulares, como la mioglobina, mantienen una estructura compacta única, estabilizada por enlaces covalentes y no covalentes. En general, las proteínas pueden desarrollar una carga positiva o negativa de acuerdo al pH al que se encuentren. Esto se debe a la presencia de grupos ionizables como carboxilos y aminos de las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman la proteína. De este modo, en la proteína pueden producirse interacciones electroestáticas entre los grupos de las cadenas laterales cargadas positiva y negativamente.

Por ejemplo, un grupo amino de la cadena lateral de la lisina puede situarse cerca del grupo carboxilo de algún residuo de ácido glutámico. Es decir, a pH neutro, un grupo se cargará positivamente y el otro negativamente, de modo que existe una fuerza electroestática de atracción entre ellos, denominada puentes salinos (Mathews, 2004). Estos enlaces se rompen cuando la proteína se coloca en un medio con valores de pH lo suficientemente bajos o elevados para que una u otra de las cadenas laterales pierda su carga. Esta pérdida de puentes salinos explica en parte la desnaturalización ácida o básica de las proteínas. Así, una desnaturalización alcalina implica la neutralización de la carga positiva de cadenas laterales de lisina, histidina y arginina, mientras que una desnaturalización ácida implica la protonación del ácido aspártico y glutámico. Ambos casos, impiden la formación de una interacción electrostática afectando el número de puentes salinos que estabilizan la estructura nativa de la proteína, pudiendo ser un factor que contribuya a la desestabilización de la estructura proteica (Mathews, 2004).

A la fecha, diversos estudios realizados han demostrado que la mioglobina es más propensa a la oxidación en condiciones ácidas, evidenciado por el aumento en la formación de metamioglobina. A pH ácidos (3-6), el aumento en la protonación de la mioglobina induce a cambios conformacionales, resultando en el despliegue de la globina (Chaijan et al., 2007). Además, bajo estas condiciones se reduce la estabilidad del enlace hemoglobina, generando un aumento en la velocidad de oxidación (Chen y Chow, 2001). Esta velocidad de oxidación es dependiente de la especie, y se atribuye a las diferencias en las estructuras primaria y secundaria de la proteína (Kitahara et al., 1990; Aranda IV et al., 2009).

Temperatura

El uso de bajas temperaturas es una de las técnicas más importantes en la conservación del pescado. Después de ser capturado, el pescado normalmente es mantenido en hielo antes de su descarga. Es común suponer que si una proteína se mantiene a bajas temperaturas se podrá conservar mejor su estructura. Sin embargo, aun durante esta etapa y el almacenamiento, se hacen evidentes cambios indeseables de color en el músculo (Chaijan et al., 2008).

Durante el almacenamiento a bajas temperaturas, el desequilibrio de las interacciones hidrófobas que contribuyen a mantener la estructura nativa de las proteínas, se ven debilitadas (Mathews, 2004). Esto ha sido atribuido a que durante el almacenamiento a bajas temperaturas, las moléculas de agua sufren un ordenamiento que rompe con las interacciones hidrófobas causando cambios en la conformación de las proteínas. Por lo tanto, el descenso en la temperatura tiende a producir cambios estructurales en aquellas moléculas

proteicas que son dependientes de las interacciones hidrófobas para mantener su estructura terciaria (Mathews, 2004).

Diversos estudios muestran que durante el almacenamiento a bajas temperaturas, la formación de metaMb aumentan con el tiempo del almacenamiento (Chaijan et al., 2005; Rawdkuen et al., 2008; Thiansilakul et al., 2010). Sin embargo, se observa que con el aumento del tiempo del almacenamiento, el porcentaje de desnaturalización de mioglobina incrementa, lo que indica una desestabilización de la misma de la estructura siendo aun mayor este fenómeno, con el almacenamiento en congelación (Chen, 2003).

Metamioglobina Reductasa

La presencia en el músculo de agentes reductores enzimáticos como la metamioglobina reductasa y no enzimáticos como el NADP(H) son factores que determinan la acumulación de la metamioglobina en el músculo. Se ha sugerido que la presencia de la enzima metamioglobina reductasa en el músculo es la responsable de la retardación de los cambios de color en el músculo. Además, se cree que durante el almacenamiento del músculo, el deterioro celular genera la liberación de nucleótidos de pirimidina como el NADP(H) que puede estar involucrado en la reducción de la metamioglobina. (Chaijan et al., 2005).

Presión Parcial del Oxígeno

La Ley de Henry establece que la concentración de cualquier gas disuelto en un líquido es proporcional a la presión parcial de ese gas sobre el

líquido. Por tanto, el efecto de la presión parcial del oxígeno sobre la mioglobina producirá oxiMb cuando el músculo se encuentre bajo altas presiones de este gas. Lo anterior genera un aspecto agradable en el músculo. Por otro lado, a bajas presiones de oxígeno, el hierro hemo de la mioglobina se oxidará generando el indeseable color marrón del pigmento de la metaMb.

La prevención de la oxidación de la mioglobina, puede ser evitada por el tipo de empaque que se emplee. Así, un empaque completamente impermeable al oxígeno, facilita la presencia de la desoxiMb en el músculo. Por el contrario, la penetración del gas, generará una baja presión parcial del oxígeno que favorecerá la formación de metaMb.

Evaluación Preliminar de los Cambios de Color en el Músculo del Cochito

Para identificar las causas que originan los cambios de color en el músculo del cochito Puente-Zepeda (2003) evaluó la presencia de astaxantina en el mismo, para evaluar si la dieta de este pez afecta la fijación de la astaxantina en su músculo y si durante el almacenamiento de este pigmento sufría cierta degradación, que pudiese ser asociada con los cambios de color del filete de cochito durante su almacenamiento en hielo. Se encontró que solo dos de 16 muestras presentaron astaxantina con una concentración promedio de 0.064 mg de astaxantina por Kg de músculo de cochito. Con ello, se estableció que la concentración reportada está muy por debajo de lo mínimo requerido para alcanzar una pigmentación visual similar a la del músculo del salmón, la cual es de 4 mg/kg músculo. Descartando con ello que el cambio de color en el músculo del cochito sea por efecto de los carotenoides o los cambios de estos durante su almacenamiento.

Por otro lado, este mismo autor evaluó los cambios de color en el músculo de cochito durante su almacenamiento por 15 días por colorimetría de triestímulo. Encontrando que en general los cambios de color en el músculo del cochito, se caracterizaban porque a medida que aumentaba el tiempo de almacenamiento los valores de L^* y b^* tienden a aumentar y por su parte los valores de a^* , tienen una tendencia a disminuir ($p \leq 0.05$). Sugiriendo en las conclusiones del estudio, que la disminución de los valores de a^* estaba relacionada con la presencia de tonalidades verdosas. Pudiendo ser este fenómeno relacionado con la oxidación de la mioglobina (Chen y Chow, 2001) o bien con un fenómeno conocido como “greening”.

Aunado a esto, se evaluó el contenido de metaMb en el músculo del cochito, en estudios preliminares y el uso de la relación de las absorbancias a 630 sobre 525 nm en un extracto acuoso de Mb del músculo del cochito con los cambios de color (L^* , a y b^*). Esta técnica establece que la relación de estas absorbancias es directamente proporcional al contenido de metaMb y que puede ser una herramienta para estimar la formación de metaMb según la metodología descrita por (Rawdkuen et al., 2008). Los resultados mostraron que durante el almacenamiento del músculo de cochito durante 10 días, no hubo formación de metaMb (ANEXO 3). Siendo estos resultados opuestos a los reportados para otras especies como el Bagre (*Pangasianodon gigas*) (Rawdkuen et al., 2008), sardina (*Sardinella gibbosa*) y macarela (*Rastrelliger Kanagurta*) (Chaijan et al., 2005), donde en general el músculo de ellos muestra un incremento en la formación de metaMb durante su almacenamiento en hielo.

Se concluye que las diferencias entre los resultados observados en el músculo del cochito con el uso de la relación de las absorbancias puede ser atribuida a la longitudes de onda empleadas para el cálculo del contenido de metaMb para el atún u otras especies (Tang et al., 2004; Viriyarattanasak et al., 2011). Se ha reportado que las longitudes de onda empleadas derivan del

espectro de absorción de la mioglobina de caballo (Krzywicki, 1982); y que al aplicar la metodología a otras especies de pescados, las longitudes de onda pueden ser distintas en función de la especie. De modo que para poder evaluar el efecto de la oxidación de la Mb se planteó la necesidad de adaptar la metodología para establecer las longitudes de onda específicas para la Mb del cochito. De modo que nos permitiera visualizar si el comportamiento inesperado era propio de nuestra especie o por la técnica aplicada.

Metodología Empleada en la Medición del Color del Músculo

El reciente aumento en la demanda por pescado fresco y congelado de alta calidad ha generado un aumento en la cantidad de investigaciones enfocados en cuantificar los cambios de color, producto de la oxidación de la mioglobina. Una manera de evaluar la oxidación de la mioglobina es mediante el empleo de la espectrofotometría visible (Viriyarattanasak et al., 2011). Su fundamento físico involucra la absorción de la radiación visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. Dado que solamente ciertas longitudes de onda son absorbidas para cada molécula, esto constituye, una característica única de la especie considerada. Así, al graficar la absorbancia de una muestra en función de la longitud de onda, se obtiene su espectro de absorción, considerándose la huella dactilar de la especie considerada.

La espectrofotometría visible basa sus mediciones cuantitativas en la aplicación de la Ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, y que además, depende de la distancia que recorre la luz por la solución; y por último, depende

de ϵ , una constante de proporcionalidad, específico de cada sustancia. Esta ley puede ser expresada de la siguiente manera:

$$A = \epsilon c l$$

Donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción, c es la concentración de la solución y l es la longitud del trayecto de la luz a través de la muestra. Como A es adimensional, las dimensiones de ϵ dependen de las unidades de l (expresada en cm) y de c (usualmente expresada en molaridad), con lo que las dimensiones de ϵ resultan ser $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar, se denomina coeficiente de extinción molar (ϵ_M).

La ley de Lambert-Beer se puede aplicar a un medio que contenga más de una clase de sustancias absorbentes, siempre y cuando no haya interacción entre las distintas especies. La absorbancia total para un sistema multicomponente, a una longitud de onda dada es igual a la suma de las absorbancias que presentan los componentes individuales (ecuación 1).

$$A_{\text{total}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n \quad (1),$$

substituyendo

$$A_{\text{total}} = \epsilon_1 C_1 l + \epsilon_2 C_2 l + \epsilon_3 C_3 l + \dots + \epsilon_n C_n l$$

Donde los subíndices se refieren a los componentes absorbentes 1, 2, 3.... n. Esta relación hace posible la determinación cuantitativa de los constituyentes individuales de una mezcla, incluso si su espectro se solapa. De la misma forma, la mioglobina muestra un espectro de absorción característico para cada forma redox como se muestra en la Figura 2. Obsérvese que no existe ninguna longitud de onda en la cual la absorbancia de la mezcla de metaMb + desoxiMb + oxiMb se deba exclusivamente a uno de los componentes. Así, la determinación de la mezcla es inadecuada con una única

medida. Sin embargo, las absorbancias de la mezcla a las tres longitudes de onda; λ_1 , λ_2 y λ_3 se pueden expresar como sigue:

$$A_{\lambda_1} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda_1} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda_1} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda_1} C_{\text{desoxiMb}} \quad (1)$$

$$A_{\lambda_2} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda_2} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda_2} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda_2} C_{\text{desoxiMb}} \quad (2)$$

$$A_{\lambda_3} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda_3} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda_3} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda_3} C_{\text{desoxiMb}} \quad (3)$$

Donde λ_1 , λ_2 y λ_3 indican las longitudes de onda óptimas para la determinación de las formas redox de la mioglobina. Es importante que las longitudes de onda seleccionadas sean aquellas donde las diferencias entre los coeficientes de extinción molares de los componentes sean grandes. Los nueve coeficientes de extinción molar pueden calcularse a partir de la disolución individual de metaMb, oxiMb y desoxiMb, a partir de las pendientes de sus representaciones gráficas de la ley de Lambert-Beer. Las absorbancias de la mezcla de A_{λ_1} , A_{λ_2} , A_{λ_3} , se determinan experimentalmente, mientras que l , el espesor de la cubeta se considera como 1, debido al tamaño de la celda. Así, las ecuaciones (1), (2) y (3) forman un sistema de tres ecuaciones con tres incógnitas (C_{metaMb} , C_{oxiMb} , C_{desoxiMb}), que pueden resolverse para calcular las concentraciones de los constituyentes individuales de la mezcla.

En base a lo anterior, Krzywicki (1982) desarrolló una serie de ecuaciones para la estimación de las concentraciones relativas de la Mb, en extractos acuosos de res. Actualmente, su amplio uso se debe a su fácil aplicación; los valores de la absorbancia se registran a diferentes longitudes de onda y son introducidos en las ecuaciones. Sin embargo, se encontró que estas ecuaciones generan valores negativos para algunas de las formas redox de la Mb, y que el total de la Mb estimado obtenido por la suma de los derivados de la Mb se desvía de la unidad. Aparentemente, la selección inadecuada de las longitudes de onda empleadas en el desarrollo de las ecuaciones parecen ser las responsables de este problema (Tang et al., 2004).

Por otro lado, recientemente se Viriyarattanasak et al., (2011) demostraron que la aplicación de las ecuaciones de Krzywicki (1982) y Tang (2004) resultó en diferencias en la estimación de los valores del % metaMb en extractos acuosos de atún, no así para extractos de res. Considerando que las ecuaciones reportadas se derivan de los espectros de absorción de la Mb de caballo, se sugirió que las diferencias en los resultados encontrados en las muestras de atún, se deben a las diferencias en los espectros de absorción de la Mb de caballo y atún. Por esta razón, se estableció un nuevo conjunto de ecuaciones a partir de los espectros de absorción de la Mb de atún (Viriyarattanasak et al., 2011).

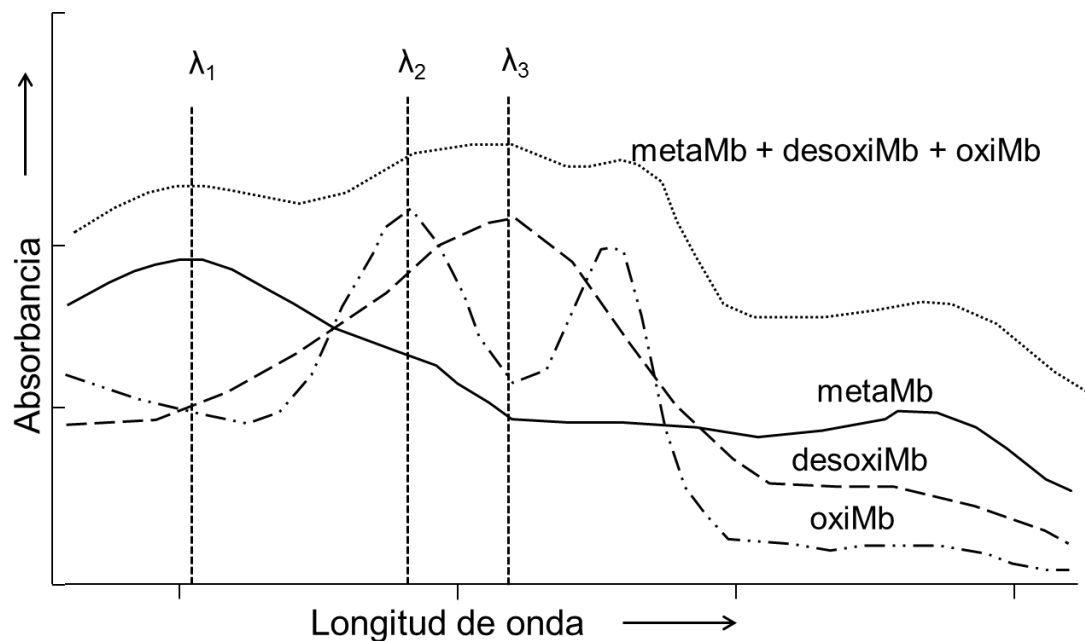


Figura 2. Espectro de absorción de una mezcla de las formas redox de la mioglobina. Las longitudes óptimas λ_1 , λ_2 y λ_3 para la determinación de los tres compuestos se indican con líneas verticales discontinuas.

A pesar de que existen algunas diferencias en los espectros de absorción entre las mioglobinas en función del tipo de pescado (Matsuura y Hashimoto, 1954; Yamaguchi et al., 1979; Chaijan et al., 2007), hasta la fecha no se ha desarrollado una ecuación adecuada derivada de los espectros de absorción del cochito y no existe un estudio que demuestre que la aplicación de las ecuaciones previamente reportadas sean adecuadas para el uso en extractos acuosos de mioglobina de cochito.

HIPÓTESIS

La formación de metamioglobina está relacionada con los cambios de color en el músculo del cochito durante su almacenamiento en hielo.

OBJETIVOS

General

Evaluar la formación de metamioglobina y su relación con los cambios de color en el músculo de cochito durante su almacenamiento en hielo.

Específicos

1. Purificar la mioglobina del cochito (*Balistes polylepis*) mediante técnicas cromatográficas.
2. Establecer un conjunto de ecuaciones espectrofotométricas derivadas de los espectros de absorción de los diferentes estados de oxidación de la mioglobina del cochito.
3. Evaluar la formación de metaMb y su relación con los cambios de color en el músculo de cochito durante su almacenamiento en hielo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en tres etapas. La etapa I consistió en la purificación de la mioglobina del cochito (*Balistes polylepis*) mediante el empleo de técnicas cromatográficas y el análisis de pureza y determinación del peso molecular de la Mb purificada. La etapa II consistió en el establecimiento de las ecuaciones espectrofotométricas a partir de la determinación de los coeficientes de extinción molar de los derivados redox de la Mb purificada. La etapa III consistió en la evaluación de la ecuación y su relación con los cambios de color durante el almacenamiento en hielo.

Reactivos

El ácido etilendiaminotetraacético o EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), Tritón[®] X-100 ($C_{30}H_{32}N_4O_8$), sulfato de amonio ($(NH_2)_2 SO_4$), glicerol ($C_3H_8O_3$), 2-mercaptoetanol (C_2H_6OS), ferrocianuro de potasio ($K_4Fe (CN)_6 \cdot 3H_2O$), ditionito de sodio ($Na_2O_4S_2$), fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), tris(hidroximetil)aminometano o tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3 HCl$), tris-base ($C_4H_{11}NO_3$), sephadex[®] G-50 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). El ácido acético (CH_3COOH) se obtuvo de J.T. Baker.

Determinación de la Concentración de Proteína

Todas las determinaciones de concentración de proteína de las soluciones de las formas redox de la Mb fueron realizadas por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando un kit para su cuantificación (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA), usando albumina sérica bovina como proteína estándar.

Etapas I: Purificación de la Mioglobina del Cochito (*Balistes polylepis*)

Materia Prima

La muestra de *Balistes polylepis* fue capturada mediante jaulas en la Costa de Bahía de Kino, Sonora en el mes de mayo de 2011. Una muestra de 20 especímenes fue obtenida usando trampas para cangrejo. Los pescados tuvieron un peso promedio de 0.47-0.83 Kg. Después de su captura, el pescado se puso en hielo con una relación pescado-hielo 1:2 (p/p) y fueron transportados a la planta piloto del laboratorio de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. en un lapso no mayor a tres horas. El pescado entero fue manualmente fileteado y los filetes se almacenaron en bolsas de plástico que contuvieran 100 g de músculo para posteriormente ser almacenada -80 ° C hasta su análisis.

Extracción y Purificación de Mioglobina del Músculo del Cochito

La extracción y purificación de la Mb se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Chaijan et al., (2008). El filete de cochito (100 g) fue homogenizado con 300 mL de buffer de extracción frío (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA y 25 g/L Tritón X-100 a una velocidad de 13 500 rpm durante 1 minuto usando un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax modelo T-25 Basic (IKA® Works, Inc. Wilmington, NC, USA). El homogenizado se centrifugó a 5000 × g por 10 min a 4 °C, usando una centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-21 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). El sobrenadante se filtró en papel filtro marca Whatman número cuatro y posteriormente se ajustó a pH 8.0 con la adición de NaOH 0.2 M usando un potenciómetro digital (Thermo, Orion 4 star, USA) a 25 °C. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta un 65 % de saturación y la suspensión fue agitada por 60 min a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 18000 × g por 20 min a 4 °C y el precipitado se descartó. El sobrenadante se filtró sobre papel filtro número cuatro, se ajustó el pH a 8.0 y se llevó a un 100 % de saturación con sulfato de amonio. La suspensión se agitó por 60 min a 4 °C y luego se centrifugó a 20000 × g por 60 min a 4 °C. El precipitado resultante, conteniendo la mioglobina, fue disuelto en un volumen de 5 mL de buffer iniciador (10mM Tris-HCl, con 1 mM EDTA, pH 8.5). La mezcla fue dializada contra 10 volúmenes del buffer iniciador por 24 h a 4 °C.

Se tomaron 5 mL del dializado y se aplicaron a una columna de Sephadex G-50 (1 x 120 cm), previamente equilibrada con el buffer iniciador. La separación se realizó a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, recolectándose 2 mL por fracción. Las fracciones que contuvieron mioglobina fueron combinadas y purificadas por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un cromatógrafo AKTA-FPLC (GE Healthcare, Suecia), sobre una columna

preempacada HiTrap DEAE F F (Dietilaminoetil flujo rápido por sus siglas en inglés) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) de 5 mL. Después de lavar la columna con el buffer iniciador, la elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 1 M NaCl en el buffer iniciador a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se recolectaron fracciones de 3 mL.

Durante la purificación, las fracciones fueron monitoreadas a 280 y 540 nm usando un espectrofotómetro UV-Visible (Varian, USA). Las fracciones con mayor absorbancia a 540 nm fueron evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como se describe a continuación.

Análisis de Pureza y Determinación de Peso Molecular de las Fracciones

La pureza y el peso molecular (PM) de la Mb se evaluaron por análisis electroforético en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). Las muestras de proteína o fracciones separadas anteriormente, se mezclaron a una relación 1:1 (v/v) con buffer muestra (0.5 M tris-HCl, pH 6.8, conteniendo 4 % SDS, 20 % glicerol y 10 % 2-mercaptoetanol). Las muestras (20 µg de proteína) fueron cargadas en un gel de poliacrilamida compuesto de un gel superior al 4 % y un gel de separación al 15 %. La corriente eléctrica para cada gel se mantuvo a 15 mA usando la unidad para electroforesis Mini Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, USA). Después de la separación, las proteínas fueron teñidas con 0.1 % (p/v) de azul de Coomassie R-250 en 50 % (v/v) de metanol y 10 % (v/v) de ácido acético, y desteñidas con 40 % (v/v) y 7 % (v/v) de ácido acético. Un estándar de proteína de amplio rango que contenía miosina (200 KDa), beta-galactosidasa (116.2 KDa), fosforilasa b (97.4 KDa), albúmina de suero (66.2 KDa), ovoalbúmina (45 KDa),

anhidrasa carbónica (31 KDa), inhibidor de tripsina (21.5 KDa), Lisozima (14.4) y aprotinina (6.5 KDa) fue usado para la estimación del PM. El análisis densitométrico de las bandas de proteína fue realizado utilizando el programa Quantity One versión 4.1 (Bio-Rad Modelo GS-700 Imaging densitometer, USA).

Etapa II: Establecimiento de las Ecuaciones Espectrofotométricas para la Determinación de las Formas Redox de la Mioglobina

Preparación de las Formas Redox de la Mioglobina

La metaMb, oxiMb y desoxiMb se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Tang et al., (2004). La metaMb se preparó agregando a 5 mL de la solución de mioglobina, previamente purificada (2 mg/mL), 50 mg de ferrocianuro de potasio para asegurar que toda la Mb fuera completamente oxidada. El ferrocianuro de potasio fue removido dializando contra 10 volúmenes de buffer de fosfato 40 mM, pH 6.8 con 10 cambios. La desoxiMb se preparó adicionando 50 mg de ditionito de sodio a 5 mL de la solución de Mb purificada (2 mg/mL) para la reducción de la Mb. El ditionito de sodio fue removido dializando contra 10 volúmenes de buffer de fosfato 40 mM, pH 6.8 con 10 cambios. La oxiMb fue obtenida por la agitación de la solución de desoxiMb haciendo pasar gas oxígeno a través de la solución a una velocidad de 3 mL/min durante 1 h. La concentración de cada derivado de Mb fue ajustada a 0.2 mg/mL con 50 mM buffer de fosfato, pH 7.0. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

Espectros de Absorción de las Formas Redox de la Mioglobina

Los espectros de absorción de los derivados de Mb (preparados en el apartado anterior) se elaboraron utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (Varian, USA), modalidad double beam. Para ello se siguió la metodología descrita por Chaijan et al., (2005). Los espectros de las soluciones de los derivados de mioglobina se registraron haciendo barridos desde los 350 a los 750 nm a una velocidad de barrido de 1000 nm/min. Se utilizó buffer de fosfato 40 mM pH 6.8 como blanco para ajustar la línea base. De los espectros obtenidos, se determinó las longitudes de onda (λ) a las cuales cada forma redox de la Mb presenta su pico de máxima absorción.

Cálculo de los Coeficientes de Extinción Molar por la Ley de Lambert-Beer.

Para calcular los coeficientes de extinción molar, se preparó una serie de diluciones de concentración conocida a partir de cada derivado de Mb. Para ello se utilizó buffer de fosfatos 40mM pH 6.8 como diluyente. Se determinó la absorbancia de cada serie de dilución midiendo a las λ de máxima absorción de cada derivado de Mb previamente seleccionadas. Los datos obtenidos se graficaron representando los valores de absorbancia obtenidos (ordenadas) *versus* los correspondientes de concentración (abscisas) para asegurar que se cumpliera la ley de Lambert-Beer. Los coeficientes de extinción molar de cada λ fueron calculados a partir de la línea de tendencia determinada por medio de regresión lineal.

Desarrollo de Ecuaciones para Cálculo de Concentraciones de las formas Redox de la Mioglobina.

Una vez establecidos los coeficientes de extinción molar del paso anterior, se estableció un nuevo conjunto de ecuaciones modificadas para el cálculo de los derivados de la Mb por la resolución del sistema de ecuaciones simultáneas de acuerdo a la metodología de Krzywicki (1982). Estableciendo que un extracto acuoso de músculo de cochito contiene los tres estados redox de la Mb (metaMb, oxiMb y desoxiMb), se estableció que el siguiente conjunto de ecuaciones era necesario para calcular cada uno de los derivados de la Mb:

$$A_{\lambda 1} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda 1} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda 1} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda 1} C_{\text{desoxiMb}} \quad (1)$$

$$A_{\lambda 2} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda 2} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda 2} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda 2} C_{\text{desoxiMb}} \quad (2)$$

$$A_{\lambda 3} = \varepsilon^{\text{metaMb}}_{\lambda 3} C_{\text{metaMb}} + \varepsilon^{\text{oxiMb}}_{\lambda 3} C_{\text{oxiMb}} + \varepsilon^{\text{desoxiMb}}_{\lambda 3} C_{\text{desoxiMb}} \quad (3)$$

Donde A es la absorbancia a la longitud de onda (λ) seleccionada; C_{metaMb} , C_{oxiMb} , C_{desoxiMb} , son las concentraciones milimolar de metaMb, oxiMb y desoxiMb, respectivamente, en el extracto acuoso; $\lambda 1$, $\lambda 2$ y $\lambda 3$ son las longitudes de onda de máxima absorción seleccionadas para metaMb, oxiMb y desoxiMb, respectivamente; ε es el coeficiente de extinción milimolar a la longitud de onda específica para los derivados de la Mb del cochito previamente calculados.

Etapa III: Evaluación de la Ecuación y su Relación con los Cambios de Color
Durante el Almacenamiento en Hielo

Materia Prima

Para esta etapa, la muestra (*Balistes polylepis*) se capturó mediante jaulas en la Costa de Bahía de Kino, Sonora en el mes de noviembre de 2011. Una muestra de 30 especímenes fue obtenida usando trampas para cangrejo. El pescado tuvo un peso promedio de 0.3-0.6 Kg. Después de su captura, el pescado se puso en hielo con una relación pescado-hielo 1:2 (p/p) y transportados a la planta piloto del laboratorio de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. en un lapso no mayor a tres horas. El pescado entero fue manualmente fileteado y embolsado para ser almacenados dentro de hieleras, en capas de hielo con una relación filete-hielo 1:2 (p/p). Para mantener el contenido de hielo se realizaron recambios de del mismo cada 2 días. Para realizar los análisis, durante el periodo de almacenamiento, 8 filetes de pescado fueron tomados aleatoriamente en cada día de muestreo, a los 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días. Los músculos de cochito fueron mantenidos en hielo durante los análisis.

Determinación de pH

El pH del músculo se midió a 25 °C usando un potenciómetro digital (Thermo, Orion 4 star, USA) a un homogenizado de 2 g de muestra con 18 mL de agua destilada siguiendo la metodología descrita por Rawdkuen et al., (2008).

Medición del Color del Músculo

El color se midió directamente sobre el músculo, empleando el sistema de medición de colorimetría de triestímulo utilizando un colorímetro portátil Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc. Tokio, Japón). Se obtuvieron los parámetros de luminosidad (L^*), matiz rojo-verde (a^*) y matiz amarillo-azul (b^*). A partir de estos valores se calculó el índice de enrojecimiento (a^*/b^*) como se describe en la metodología de Chaijan et al., (2005).

Determinación de las Concentraciones de las Formas Redox de la Mb Durante el Almacenamiento

Las concentraciones de los derivados de Mb del músculo del cochito fue determinado por medición espectrofotométrica directa, como lo describe (Benjakul y Bauer, 2001). La muestra (2 g) fue pesada dentro de un tubo de centrifuga de 50 mL de polipropileno y se agregó 20 mL de buffer de fosfatos 40 mM (pH 6.8) frío. La mezcla fue homogenizada a una velocidad de 13,500 rpm por 10 segundos usando un homogenizador de tejidos Ultra-Turrax modelo T-25 Basic (IKA[®] Works, Inc. Wilmington, NC, USA). Inmediatamente, el homogenizado fue centrifugado a $7090 \times g$ por 30 minutos a 4 °C, usando una centrífuga refrigerada Beckman modelo J2-21 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). El sobrenadante se filtró por papel filtro Whatman No. 1 y sujetó a medición de su espectro de absorción. El espectro se registró haciendo un barrido desde los 350 a los 750 nm a una velocidad de barrido de 1000 nm/min, usando como blanco buffer de fosfato 40 mM, pH 6.8 para ajustar la línea base.

Las concentraciones de los derivados de la Mb fueron calculados usando las ecuaciones resumidas en la Tabla 3 y por la nueva ecuación. El contenido de mioglobina fue expresado como mg/g músculo.

Análisis Estadístico

Todos los experimentos se analizaron por duplicado con tres repeticiones. Los datos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA). La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba múltiple de rangos de Duncan con un nivel de confiabilidad del 95 %. Se utilizó el programa estadística NCSS versión 2001. Donde el modelo estadístico empleado correspondiente es el siguiente.

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Dónde:

Y = Variables de respuesta

μ = Efecto de la media general

T= Efecto de los tratamientos (en días)

ε = Error experimental

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa I: Purificación de la Mioglobina del Cochito (*Balistes polylepis*)

La Mb del músculo de cochito fue extraída y purificada por las cuatro etapas descritas en la sección de materiales y métodos. El precipitado obtenido de la primera etapa fue purificado por filtración en gel utilizando una columna empacada con Sephadex G-50. En esta etapa se observaron dos picos principales con absorbancia a 540 nm (Figura 3). Si se relacionan estos datos con la determinación en el peso molecular (PM) por SDS-PAGE (Figura 5), el primer pico probablemente sería el correspondiente a hemoglobina y otras proteínas de alto PM, mientras que el segundo pico se consideraría solo Mb como componente principal. Este paso mostró fracciones de color marrón obtenidas en la purificación. Para el siguiente paso de purificación de la Mb, las fracciones del segundo pico (38 a 42) fueron mezcladas y aplicadas a una columna de intercambio aniónico DEAE FF. Después de lavar y eluir con un gradiente lineal de NaCl (0-1 M), un pico principal con fracciones de color marrón eluyó a 0.15-0.20 M (Figura 4), considerado este como Mb, de acuerdo a la determinación de su PM por SDS-PAGE (Línea 5, Figura 5).

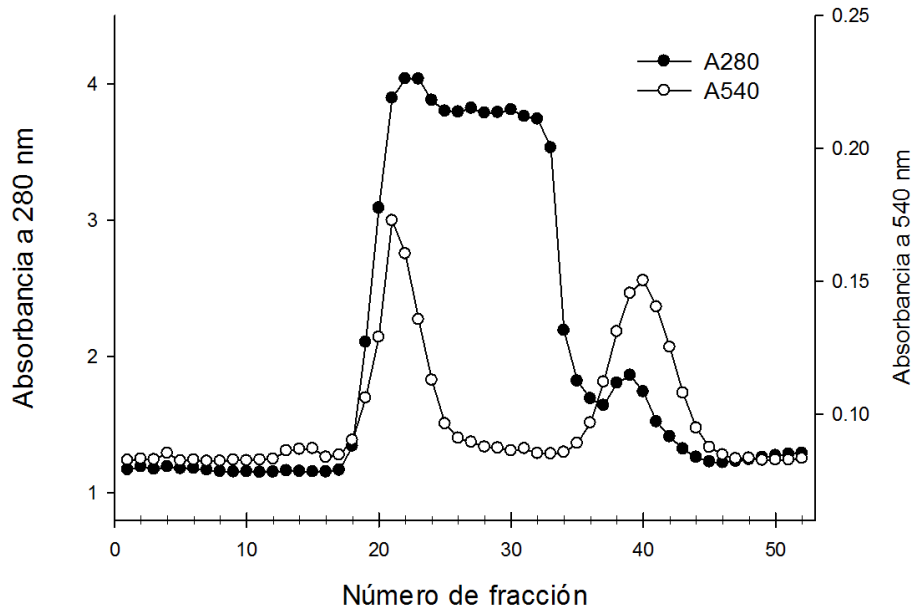


Figure 3. Perfil de elución de mioglobina de músculo cochito usando una columna con Sephadex G-50. La columna fue equilibrada y eluida con buffer Tris-HCl 10 mM pH 8.0 conteniendo 1 mM de EDTA. La velocidad de flujo fue de 0.1 mL/min y se recolectaron fracciones

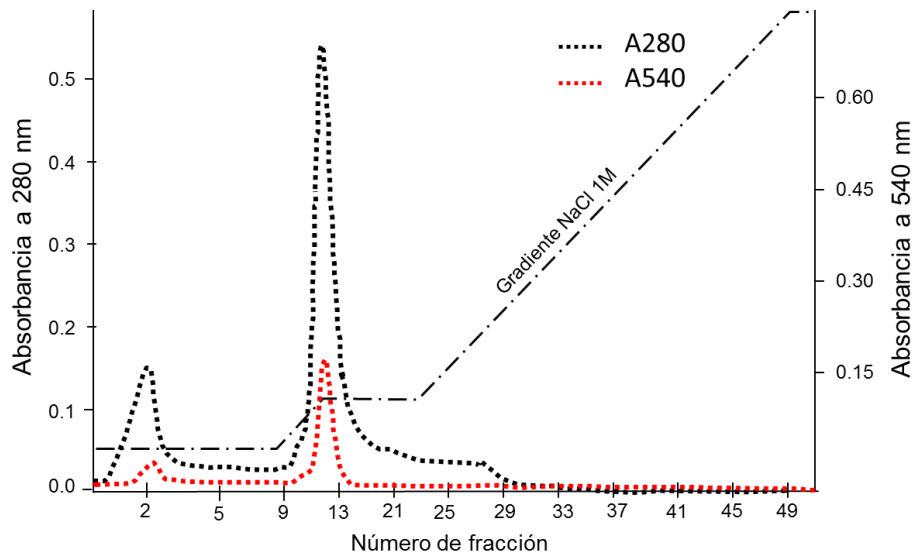


Figure 4. Cromatograma de elución de Mb de cochito por intercambio iónico utilizando una columna DEAE FF. La mezcla de fracciones de la cromatografía en sephadex G-50 fue inyectada a un flujo de 5 mL/min.

Los patrones de SDS-PAGE de los extractos de Mb del cochito obtenidos durante el proceso de purificación se muestran en la Figura 5. En el extracto crudo de Mb del músculo se encontró que las proteínas con PM mayores a 35 KDa fueron abundantes (línea 2, Figura 5). Después de la precipitación con sulfato de amonio (65-100% de saturación), las proteínas con un PM mayor a 70 KDa fueron removidas, mientras que las proteínas con un PM de 64, 47 y 42 KDa se encontraron en mayor proporción (línea 3, Figura 5). En la cromatografía por filtración en gel, la mayoría de las proteínas con PM mayores a 17 KDa fueron removidas, mientras que la banda de proteína con PM de 15.8 KDa se intensificó (línea 4, Figura 5). Por último, en la cromatografía de intercambio iónico, la proteína con PM de 15.81 KDa, fue predominante (línea 5, Figura 5).

El análisis densitométrico muestra que la banda que corresponde a la Mb representa el 100 % del total de proteínas presentes en las fracciones mezcladas obtenidas de la cromatografía por intercambio iónico (línea 5, Figura 5). El resultado del proceso de purificación indica que el aumento de la pureza total se alcanzó después de aplicar tres etapas (Tabla 1). En la etapa final de purificación se logró un rendimiento de Mb del 1.08 % en 5 mL con una concentración de 0.4 mg/mL. El PM de la Mb purificada del músculo de cochito fue establecido en 15.81 KDa. Generalmente los PM de las Mbs de peces son de menor masa que las de mamíferos. El PM de la Mb de cochito fue similar a los de otras especies de pescados como la sardina (*Sardinella gibossa*), atún bacoreta (*Euthynnus affinis*) y “milkfish” (*Chanos chanos*) con valores de 15.3 KDa, 15.68 KDa y 15.9 KDa respectivamente (Chen y Chow, 2001; Chaijan et al., 2007; Thiansilakul et al., 2011). Mientras que los PM de las Mbs de porcino, ovino y semen de ballena son de 17.70, 17.1 y 17 KDa, respectivamente (Renner et al., 1992).

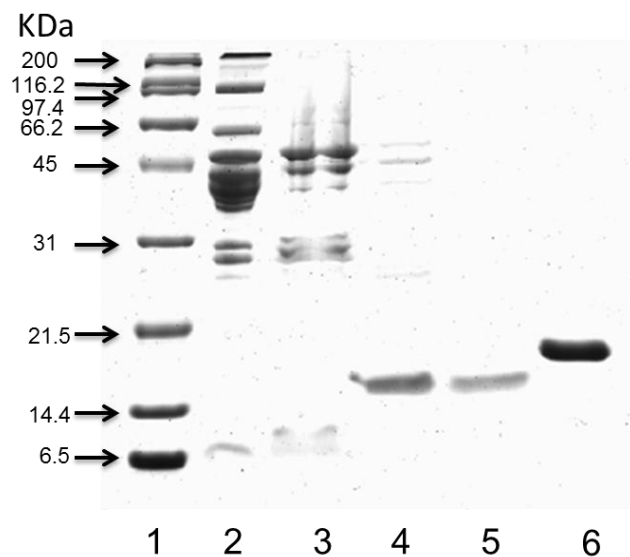


Figure 5. Patrón de SDS-PAGE del proceso de purificación de Mb del músculo de cochito. Línea 1, marcadores de amplio rango; línea 2, extracto crudo; línea 3, fracción precipitada con sulfato de amonio; línea 4, fracciones (38-42) de sephadex G-50; línea 5, fracciones (11-13) de DEAE FF; línea 6, mioglobina de caballo.

Tabla 1. Resumen de purificación de la mioglobina del músculo de cochito.

Etapas de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg/mL)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	264	14.9	100
(NH ₄)SO ₄ (60-100%)	280	5.3	100
Sephadex G-75	10	0.88	2.32
DEAE FF	5	0.41	1.08

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C

Etapa II: Establecimiento de las Ecuaciones Espectrofotométricas para la
Determinación de las Formas Redox de la Mioglobina

Espectros de Absorción de los Derivados de Mioglobina de Cochito

Los espectros de absorción de las formas redox de la Mb del músculo de cochito se muestran en las Figuras 6 y 7. De la Figura 6 se puede observar que los picos de máxima absorción (o bandas de Soret) para la metaMb, oxiMb y desoxiMb se localizaron en los 408, 414 y 432 nm, respectivamente. Resultados similares han sido reportados para las especies de atún bacoreta (*Euthynnus affinis*) con valores de 407 y 413 y aleta amarilla (*Thunnus albacares*) con valores de 406 y 414 para la metaMb y oxiMb, respectivamente (Smulevich et al., 2007; Thiansilakul et al., 2011). Asimismo, Swatland (1989) reportó que las bandas de Soret para la metaMb, oxiMb y desoxiMb de carne de res fueron de 410, 416 y 434 nm, respectivamente. Estas diferencias en los cambios de absorbancia entre especies pueden atribuirse a los cambios en la estructura primaria de las Mb (Ueki et al., 2005). Por otro lado, se conoce que el desplazamiento en la longitud de onda de máxima absorción en más de 5 nm son causados por el efecto aditivo de la sustitución de 3 a 10 aminoácidos en la estructura proteica de las opsinas (proteínas responsables de absorber la luz en la retina) (Yokoyama, 1995; Yokoyama y Tada, 2003). Por otro lado, el desplazamiento de las bandas de Soret demuestra que puede ser usado para monitorear la degradación de la mioglobina en el músculo del cochito (Baron et al., 2002).

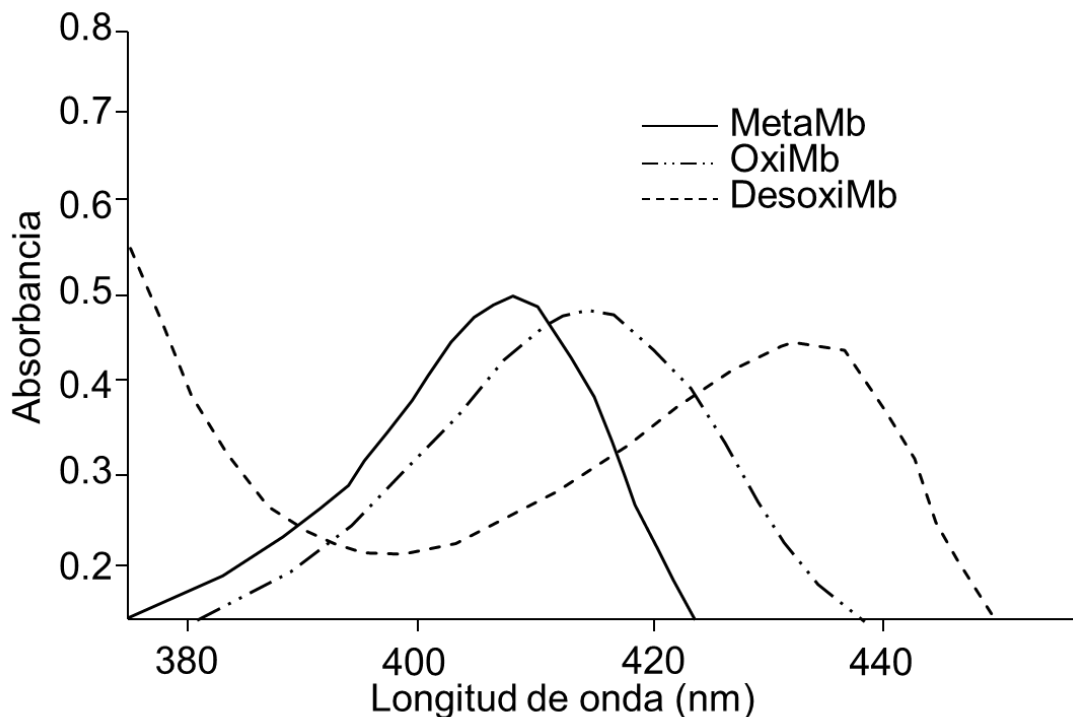


Figure 6. Espectros de absorción de las formas redox de la mioglobina del músculo del cochito en la región de Soret (350-450 nm).

Las longitudes de onda de máxima absorción (λ_{\max}) en la región visible del espectro (450-750 nm) de las formas redox de la Mb del cochito fueron localizados a los 503 y 630 nm para la metaMb, 542 y 578 nm para la oxiMb, y 560 nm para la desoxiMb (Figura 7). Estos resultados fueron similares a los reportados para las formas redox de la Mb del atún patudo (*Thunnus obesus*), con valores de λ_{\max} de 500 y 625 nm para la metaMb, 540 y 572 nm para la oxiMb, y 555 nm para la desoxiMb (Viriyarattanasak et al., 2011); así como los reportados en atún bacoreta (*Euthymmus affinis*) con valores de 502 y 630 nm para la metaMb y 542 y 577 nm para la oxiMb (Thiansilakul et al., 2011). Al igual que para las bandas de Soret, estos “ligeros” desplazamientos en los λ_{\max} entre las diferentes especies de pescados pueden estar relacionados a los cambios en la estructura primaria de las Mb (Ueki et al., 2005). Además, estos resultados

muestran que los espectros de absorción entre los derivados de Mb del cochito y los reportados para las especies de atún tienen casi el mismo patrón característico de su espectro de absorción. Brow et al. (1962) reportó valores muy similares para los picos máximos de absorción de las formas redox de la Mb en las especies de atún bonito (*Thunnus alalunga*), aleta azul (*Thunnus orientalis*) y aleta amarilla (*Thunnus albacares*).

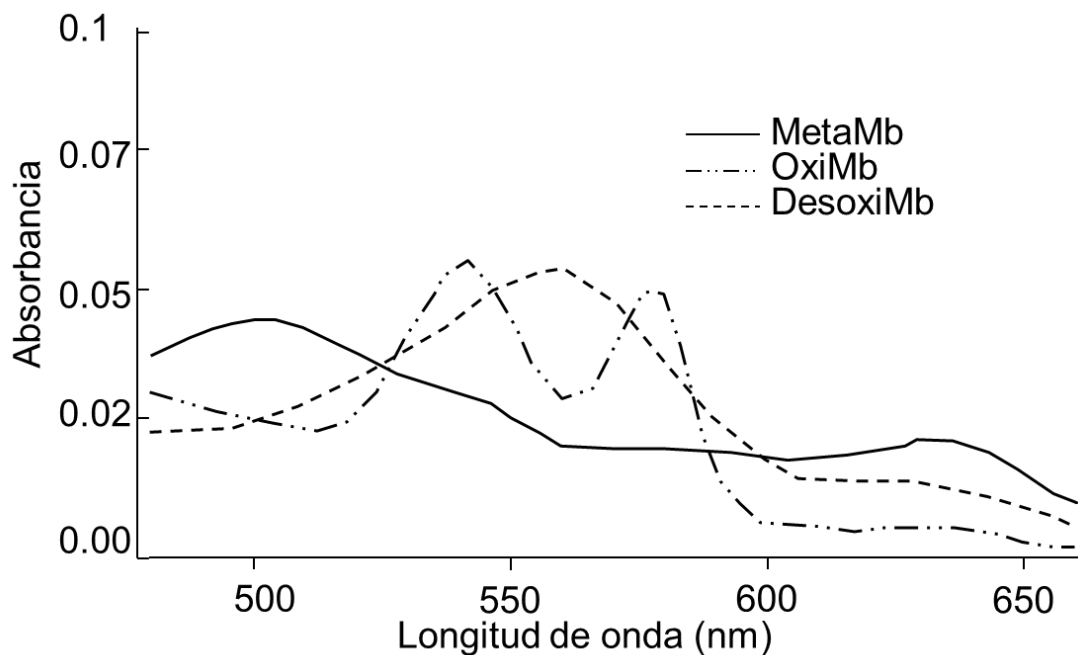


Figure 7. Espectros de absorción de las formas redox de la mioglobina del músculo del cochito en la región visible (450-750 nm).

Por otro lado, se encontró que existen algunas similitudes y diferencias entre los espectros de absorción de las formas redox para la Mb de cochito y caballo. Se encontró que los espectros de absorción de las formas redox de la metaMb y desoxiMb de caballo, con valores de 503 y 632 para la metaMb y 557 para la desoxiMb, resultan ser muy similares a los de los de nuestro estudio y

las especies antes mencionadas. No así, para el espectro de absorción de la oxiMb, que presenta dos picos de máxima absorción a los 542 y 582 nm (Viriyarattanasak et al., 2011). Siendo su principal diferencia la longitud de onda de máxima absorción localizada a los 582, la cual se encuentra desplazada varios nm en comparación con las registradas para las demás especies de pescados. Además, en los espectros de absorción de Mb de pescados, no se presenta ningún punto isobéptico (intersección), donde los coeficientes de extinción molar de los tres derivados son equivalentes. Este punto isobéptico, localizado a los 525 nm, es característico en los espectros de absorción de los derivados de Mb de caballo (Viriyarattanasak et al., 2011).

Para el presente estudio las longitudes de onda de 503, 542 y 560 nm fueron seleccionadas para el desarrollo de la ecuación porque representan las longitudes de onda de máxima absorción de metaMb, oxiMb y desoxiMb, respectivamente. Estas fueron utilizadas para determinar los coeficientes de extinción molar de las formas redox de la Mb del músculo del cochito.

Cálculo de los Coeficientes de Extinción Molar por la Ley de Lambert-Beer

En la Tabla 2 se muestran los coeficientes de extinción molar obtenidos a las longitudes de onda de máxima absorción seleccionadas para el desarrollo de las ecuaciones espectrofotométricas para determinar las formas redox del músculo del cochito. Además, en la tabla se muestran los valores de los coeficientes de extinción molar usados para el desarrollo de las ecuaciones para el cálculo de las formas redox de la Mb de atún y de caballo.

Tabla 2. Coeficientes de extinción molar ($\epsilon/\text{mM}/\text{cm}$) a las longitudes de onda de máxima absorción seleccionadas para establecer las ecuaciones (4) y (5) para las tres formas redox de la mioglobina.

Forma redox	Coeficientes de extinción molar			λ (nm)
<i>Cochito (Balistes polylepis)</i>				
metaMb	1.90	2.26	1.74	503
oxiMb	1.35	3.69	2.92	542
desoxiMb	0.92	2.51	3.60	560
<i>Atún patudo (Thunnus obesus)*</i>				
metaMb	8.90	6.13	4.63	500
oxiMb	5.30	14.60	10.13	540
desoxiMb	3.50	9.30	12.24	555
<i>Caballo (Sigma-Aldrich)**</i>				
metaMb	9.84	4.05	3.29	503
punto isobéptico	7.60	7.60	7.60	525
oxiMb	5.73	9.47	14.37	557
desoxiMb	5.05	12.30	8.64	582

* Datos tomados de Matsuura y Hashitomo (1995), los datos calculados en base al hierro equivalente.

** Datos tomados de Tang et al., (2004), calculados en base a la concentración de Mb.

Desarrollo de Ecuaciones para Cálculo de Concentraciones de las Formas Redox de la Mioglobina.

Una vez establecidos los coeficientes de extinción molar (Tabla 2) para las longitudes de onda en las cuales se presentan los máximos de absorción para cada forma redox de la Mb del cochito (Benesh, 1973; Tang et al, 2004). Estos fueron incorporados en el sistema de ecuaciones lineales (1), (2) y (3) planteados en la metodología. Las soluciones del sistema de ecuaciones se presentan como siguen:

$$C_{\text{metaMb}} = 0.9313 A_{503} - 0.5885 A_{542} + 0.0249 A_{560} \quad (4)$$

$$C_{\text{oxiMb}} = -0.3432 A_{503} + 0.8214 A_{542} - 0.4997 A_{560} \quad (5)$$

$$C_{\text{desoxiMb}} = 0.0014 A_{503} - 0.4236 A_{542} + 0.6207 A_{560} \quad (6)$$

$$C_{\text{total}} = C_{\text{metaMb}} + C_{\text{oxiMb}} + C_{\text{desoxiMb}} \quad (7)$$

Debido a que el espectro de absorción de la mioglobina de cochito no mostró la presencia de ningún punto isobéptico (Figura 7), el cálculo de las concentraciones de las formas redox de la Mb se realizó con base a la suma de cada una de las formas redox, como se muestra en la ecuación (7) (Viriyarattanasak et al., 2011).

En la Tabla 3 se muestran las ecuaciones espectrofotométricas utilizadas para la determinación de las formas redox de la mioglobina de varias especies. Dentro de éstas, las primeras cuatro derivan de los espectros de absorción de las formas redox de la mioglobina de caballo usando la metodología de

Krzywicki (1979). En ellas se incluye la absorbancia a longitud de onda de 525 nm, que representa el punto isobéstico para las tres formas redox de la mioglobina, seleccionado para determinar la concentración total de la Mb. La absorbancia a 572 nm, representa el punto isobéstico para las formas redox oxiMb y desoxiMb de caballo y es utilizado para el cálculo de las concentraciones de estas formas. La absorbancia a 700 y 730 nm han sido seleccionadas para la corrección ocasionada por turbidimetría, que es difícil de remover en los extractos acuosos de carne (Viriyattanasak et al., 2011). Por otro lado, para el desarrollo de las ecuaciones (3), la selección de las longitudes de onda utilizadas a 545 nm, 565 nm y 572 nm, parece ser con base a una selección un tanto arbitraria (Tang et al., 2004).

Las ecuaciones (3) se han empleado en numerosos estudios, sin embargo, Tang et al. (2004) informó que el uso estas ecuaciones generan valores negativos para algunas de las formas redox de la Mb y que el porcentaje total de la Mb se desvía del 100 %. A consecuencia Tang et al. (2004), desarrollaron un nuevo conjunto de ecuaciones con una selección de longitudes de onda que representan los máximos de absorción para cada una de las formas redox de la Mb (ecuaciones 4).

Recientemente Viriyarattanasak et al. (2011) demostraron que la aplicación de las ecuaciones de Krzywicki (1982) y Tang et al. (2004) generan diferencias en la estimación de los valores del % metaMb en extractos acuosos de atún, no así para extractos de res. Considerando que las ecuaciones reportadas se derivan de los espectros de absorción de la Mb de caballo, los autores sugieren que las diferencias en los resultados encontrados en las muestras de atún, se deben a las diferencias en los espectros de absorción de la Mb de caballo y atún. Por esta razón, se estableció un nuevo conjunto de ecuaciones a partir de los espectros de absorción de la Mb de atún (ecuaciones 5) (Viriyarattanasak et al., 2011).

Puesto que las ecuaciones (4) se han utilizado para el cálculo del % metaMb en extractos acuosos de atún y las ecuaciones (5) se elaboraron con base a los espectros de absorción de una especie de pescado, que muestra similitud en los espectros de absorción de las formas redox de las Mbs del cochito, ambas ecuaciones fueron seleccionadas para estimar y comparar el % metaMb en extractos acuosos de Mb del cochito del presente estudio.

Tabla 3. Ecuaciones espectrofotométricas para la determinación de las concentraciones de las formas redox de la mioglobina reportadas en la literatura.

Ecuaciones		
1)	% metaMb	$= (1.395 - ((A_{572} - A_{700}) / (A_{525} - A_{700}))) \times 100$
2)	% metaMb	$= (1.395 - ((A_{572} - A_{730} \times 1.45) / (A_{525} - A_{700} \times 1.73))) \times 100$
	% metaMb	$= (-2.514R1 + 0.777R2 + 0.80 R3 + 1.090) \times 100$
3)	% desoxiMb	$= (0.369R1 + 1.140R2 - 0.941R3 + 0.015) \times 100$
	% oxiMb	$= (0.882R1 - 1.267R2 + 0.809R3 - 0.661) \times 100$
		$R1 = A_{572} / A_{525} \quad R2 = A_{565} / A_{525} \quad R3 = A_{545} / A_{525}$
	% metaMb	$= (-0.159R1 - 0.085R2 + 1.262R3 - 0.520) \times 100$
4)	% desoxiMb	$= (-0.543R1 + 1.594R2 + 0.552R3 - 1.329) \times 100$
	% oxiMb	$= (0.722R1 - 1.432R2 - 1.659R3 + 2.599) \times 100$
		$R1 = A_{582} / A_{525} \quad R2 = A_{557} / A_{525} \quad R3 = A_{503} / A_{525}$
	% metaMb	$= (0.150 A_{500} - 0.05675 A_{540} - 0.0097 A_{555}) \times 100$
5)	% desoxiMb	$= (-0.0522 A_{500} + 0.1646 A_{540} - 0.1164 A_{555}) \times 100$
	% oxiMb	$= (-0.0032 A_{500} - 0.1088 A_{540} + 0.173 A_{555}) \times 100$

(Krzywicki, 1979), (Krzywicki, 1982), (Tang et al., 2004), (Viriyarattanasak et al., 2011)

Etapa III: Evaluación de la MetaMb y su Relación con los Cambios de Color en el Músculo de Cochito Durante su Almacenamiento en Hielo

En la Tabla 4 se muestran los valores encontrados de las formas redox (%) de la Mb del cochito usando las ecuaciones de Tang et al. (2004), Viriyarattanasak et al. (2011) y las ecuaciones desarrolladas para el cálculo de la Mb del cochito. En general se encontró que los valores calculados por las ecuaciones desarrolladas por Tang et al. (2004) y Viriyarattanasak et al. (2011) fueron considerablemente menores ($p < 0.05$) con respecto a los calculados con las ecuaciones desarrolladas para los extractos acuosos de Mb del músculo de cochito, independientemente del tiempo del tiempo almacenamiento. Resultados similares se encontraron en la comparación de la aplicación de la ecuaciones de Tang et al. (2004) y las desarrolladas para la Mb de atún por Viriyarattanasak et al. (2011) en extractos acuosos de las especies de atún patudo (*Thunnus obesus*) y aleta azul (*Thunnus orientalis*). Estas diferencias en los resultados encontrados pueden ser atribuidas a las diferencias en las longitudes de onda seleccionadas para el cálculo de cada ecuación. Debido a que existen algunas diferencias en los espectros de absorción entre las mioglobinas en función del tipo de pescado (Matsuura y Hashimoto, 1954; Yamaguchi et al., 1979; Chaijan et al., 2007), estas diferencias influyen en que los coeficientes de extinción molar sean diferentes para cada especie, como se muestran en la Tabla 2.

Por otro lado, se esperaría que los valores encontrados de metaMb empleando las ecuaciones desarrolladas para los extractos acuosos de Mb del músculo de cochito, basadas en la selección de las longitudes de onda que muestran la máxima absorción para cada forma redox de la Mb de cochito (Figura 7) sean los correctos. Para establecer si la ecuación de cochito sirve en la evaluación adecuada de las formas redox de la Mb, se evaluó si existe una

relación con las ecuaciones desarrolladas por Tang et al. (2004) y Viriyattanasak et al. (2011). En la evaluación se encontró que existe una correlación significativa ($p < 0.05$, $r^2 = 0.69$) entre la ecuación desarrollada por Tang et al. (2004) y la desarrollada para los extractos acuosos de Mb del músculo de cochito. Mientras que se observó una mayor correlación entre las ecuaciones desarrolladas por Viriyarattanasak et al. (2011) y la propuesta en este estudio ($p < 0.05$, $r^2 = 0.85$). Estos resultados muestran, que existe una correlación de la ecuación desarrollada en este estudio con las desarrolladas para res y atún, lo que indica que la ecuación propuesta en este estudio puede ser empleada satisfactoriamente para evaluar los cambios en los estados de oxidación del músculo de cochito durante su almacenamiento en hielo. Además, se observa claramente que existe una mayor relación entre las ecuaciones desarrolladas entre las especies de pescado ($p < 0.05$, $r^2 = 0.85$). Estos resultados pueden ser atribuidos a la similitud entre los espectros de absorción de las formas redox de la Mb del músculo de cochito (Figura 7) y los reportados para el músculo de atún patudo (*Thunnus obesus*). Mientras que para los espectros de absorción de la Mb de caballo difiere con lo reportado para las especies marinas (Viriyarattanasak et al., 2011).

Para validar las ecuaciones propuestas en este estudio, se determinó la concentración total de Mb en los extractos acuosos de Mb del cochito usando la ecuación propuesta y la metodología del ditionito de sodio (Chaijan et al., 2005). Los resultados mostraron una correlación significativa ($p < 0.05$, $r^2 = 0.62$) entre el contenido total de Mb determinado por el método del ditionito de sodio y por la ecuación propuesta. Viriyarattanasak et al. (2011) también encontraron una correlación significativamente positiva pero esta fue con una de $r^2 = 0.98$, sugiriendo que la ecuación propuesta en esta investigación puede ser utilizada para estimar la concentración de las formas redox de la Mb en extractos acuosos de Mb del músculo del cochito. Sin embargo, la diferencia en la

correlación de $r^2 = 0.353$ puede ser atribuida al método de validación utilizado para la Mb de cochito. Esto es, el cálculo de concentración total de Mb de cochito por el método de diotionito de sodio que implica una reducción de la mioglobina y después calcular la concentración a partir de la ley de Lambert-Beer empleando un coeficiente de extinción molar de $7.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a partir de datos de Mb de caballo a una longitud de onda de 555 nm (Chaijan et al., 2005; Viriyarattanasak et al., 2011).

Por otro lado, la mayor correlación observada para el atún se puede atribuir a que el método empleado para la validación de la ecuación desarrollada en dicha investigación implica la conversión de la Mb a cianmetaMb y el cálculo para la concentración total es a partir de un coeficiente de extinción molar de $10.36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a una longitud de onda de 540 nm específico para la Mb de atún. Para buscar aumentar la correlación en este estudio, se sugiere establecer una metodología específica para la Mb de cochito utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

Formación de metaMb y su relación con los cambios de color en el músculo del cochito

Los valores de colorimetría de triestímulo del músculo de cochito durante 15 días de almacenamiento en hielo se muestran en la tabla 6. Se observaron que los valores de L^* , a^* y b^* tuvieron cambios significativos ($p \leq 0.05$) durante el tiempo de almacenamiento en hielo. Para los valores de L^* se observó un aumento a partir del sexto día de almacenamiento, para posteriormente permanecer sin ningún cambio ($p \geq 0.05$), a^* mostró un descenso también a partir del sexto día de almacenamiento y sin ningún a cambio en tiempos posteriores. Los valores de b^* tuvieron un aumento significativo a partir del

tercer día de almacenamiento, el cual fue aumentando significativamente durante el tiempo de almacenamiento. En resumen, se puede decir que los cambios de color del músculo del cochito pueden ser descritos por un descenso en a^* y un aumento en L^* y b^* durante el tiempo de almacenamiento en hielo bajo las condiciones de este estudio.

Estos resultados tienen un comportamiento similar a los reportados para los valores de colorimetría de triestímulo de soluciones de Mb purificadas en diferentes especies de pescados, cuando la desoxiMb se transforma a metaMb (Hashimoto, 1988; Chen y Chow, 2001). Estableciendo los autores, que los valores de la colorimetría de triestímulo cambian significativamente dependiendo del estado redox de la mioglobina. Indicando con ello, que la valoración por la colorimetría de triestímulo podía ser útil en la predicción de la formación de metaMb, no solamente de la Mb purificada, si no también en el músculo del atún.

Para evaluar si existe una relación entre el % metaMb y los cambios de color en el músculo del cochito que permitan predecir la oxidación de la Mb durante el tiempo de almacenamiento, los valores de L^* , a^* y b^* y a^*/b^* se evaluaron en función del % metaMb mediante una regresión lineal. Los análisis de correlación no mostraron ninguna relación significativa ($p \geq 0.05$) entre los parámetros de color y el % metaMb. Estos resultados se asemejan a los encontrados para el músculo de atún patudo (*Thunnus obesus*) durante 15 días de almacenamiento en congelación. De acuerdo a los autores de ese estudio, estos resultados son debido a que los cambios de color en L^* , a^* y b^* no ocurren durante el tiempo de almacenamiento, por lo que la evaluación colorimétrica en la estimación del % metaMb se consideró inapropiada para el caso de esa especie de atún. Para nuestro estudio, los resultados encontrados se pueden deber específicamente a que no hubo cambios en el contenido de metaMb durante el tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de las formas redox (%) en extractos acuosos de mioglobina de cochito usando diferentes tipos de las ecuaciones y propuestas en este estudio.

Mioglobina de caballo (Krzywicki, 1982)			
Días	%metaMb	% oxiMb	%desoxiMb
0	66.65 ± 1.41a	9.88 ± 1.49a	23.92 ± 0.80a
3	66.33 ± 1.95a	11.04 ± 2.10a	22.84 ± 0.53a
6	67.33 ± 4.75a	11.13 ± 6.41a	21.72 ± 2.92a
9	67.98 ± 1.43a	7.33 ± 2.75a	25.13 ± 2.36b
12	67.11 ± 1.57a	10.86 ± 3.03a	22.08 ± 1.91a
15	66.82 ± 1.84a	10.07 ± 2.70a	23.35 ± 1.91a
Mioglobina de atún (Viriyarattanasak et al., 2011)			
0	69.38 ± 1.49a	-0.28 ± 1.91ab	30.89 ± 0.86a
3	70.43 ± 1.84a	0.91 ± 2.21ab	28.64 ± 0.56b
6	70.09 ± 3.03a	-0.68 ± 4.44ab	30.59 ± 1.79ac
9	71.41 ± 1.68a	-2.75 ± 2.11a	31.34 ± 0.61ac
12	71.65 ± 1.60a	-0.20 ± 1.95ab	28.54 ± 0.57b
15	70.31 ± 2.04a	1.66 ± 3.05b	28.02 ± 1.23b
Mioglobina de cochito (Propuesta en este estudio)			
0	79.50 ± 2.10a	-0.80 ± 2.72a	21.30 ± 1.02a
3	80.87 ± 2.30a	-2.49 ± 2.77a	21.62 ± 0.77a
6	80.00 ± 4.00a	1.22 ± 4.13ab	18.77 ± 1.00b
9	82.66 ± 3.11a	-4.38 ± 3.70ac	21.72 ± 1.19a
12	82.71 ± 1.36a	-3.95 ± 1.42ac	21.23 ± 0.61a
15	80.47 ± 2.65a	-1.20 ± 3.62a	20.73 ± 1.24a

Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 5. Concentración total de mioglobina en extractos acuosos de mioglobina de cochito por la ecuación propuesta y por el método de ditionito de sodio.

Días	Método de ditionito de sodio	Ecuación propuesta
0	2.15 ± 0.43	6.57 ± 1.50
3	2.95 ± 0.30	7.06 ± 1.15
6	0.94 ± 0.12	3.37 ± 0.81
9	1.05 ± 0.27	4.37 ± 1.22
12	1.20 ± 0.18	5.49 ± 1.51
15	1.38 ± 0.23	5.44 ± 0.94

Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, los resultados obtenidos son diferentes a los reportados para las especies de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y aleta azul (*Thunnus orientalis*), donde en dicho estudio solamente encontraron que el uso de la relación a^*/b^* predice ($r^2 = -0.725$) los cambios en la oxidación de la Mb, no así los otros parámetros evaluados (L^* , a^* y b^*) (Hashimoto, 1988). Sin embargo, cabe mencionar que este estudio no muestra los resultados estadísticos de sus correlaciones, por lo que dicha relación podría estar sujeta a demostración. Si bien, es importante señalar que aunque existe una correlación significativa entre la formación de metaMb y los cambios de color para las soluciones de Mb purificadas, al evaluar esta relación en el músculo en los músculos, no siempre existe. Esta falta de correlación, es atribuida a la complejidad del músculo (Faustman y Cassens, 1990). Se ha reportado que la presencia de agentes reductores como el NAD y FAD producidos endógenamente, son los responsables de la reducción del café de la metaMb a

la desoxiMb en el músculo fresco (Chaijan et al., 2005). Además, la enzima metaMb reductasa remanente en el músculo puede reducir la metaMb a sus otras formas redox (Chaijan et al., 2005). Sin embargo, para demostrar la falta de correlación atribuida a otros factores, habría que continuar con los estudios que demuestren la presencia de estos compuestos en el músculo del cochito y que son los responsables de la reducción de la Mb.

Tabla 6. Colorimetría de triestímulo del músculo de cochito almacenado durante 15 días en hielo (°C).

Días	L*	a*	b*
0	49.31 ± 3.03a	1.39 ± 0.86a	-1.04 ± 1.56a
3	49.99 ± 3.12a	1.34 ± 1.31a	-0.20 ± 1.55b
6	53.02 ± 4.12b	0.44 ± 0.97b	-0.15 ± 1.71b
9	52.41 ± 3.73b	0.50 ± 1.08b	0.14 ± 1.33b
12	52.34 ± 2.54b	0.42 ± 1.02b	1.28 ± 1.54c
15	52.47 ± 3.61b	0.49 ± 0.81b	1.29 ± 2.13c

Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

CONCLUSIONES

En este estudio se desarrolló un nuevo conjunto de ecuaciones derivadas a partir de los espectros de absorción de la Mb purificada del cochito. Las cuales pueden ser empleadas satisfactoriamente para evaluar los cambios en los estados de oxidación del músculo de cochito durante su almacenamiento en hielo.

Se encontró que los cambios de color (L^* , a^* y b^*) en el músculo del cochito, fueron mínimos pero significativos, pasando del cuadrante positivo a negativo para a^* y b^* .

No se presentaron cambios en la formación de metaMb en extractos acuosos de Mb del músculo de cochito durante el periodo de almacenamiento en hielo.

No existe correlación entre la formación de metaMb y los cambios de color (L^* , a^* y b^*) del mismo.

Se recomienda evaluar la presencia y sus estados de óxido-reducción de pigmentos como de citocromos y flavinas y su posible relación en los cambios de color en el músculo de cochito durante el almacenamiento en hielo.

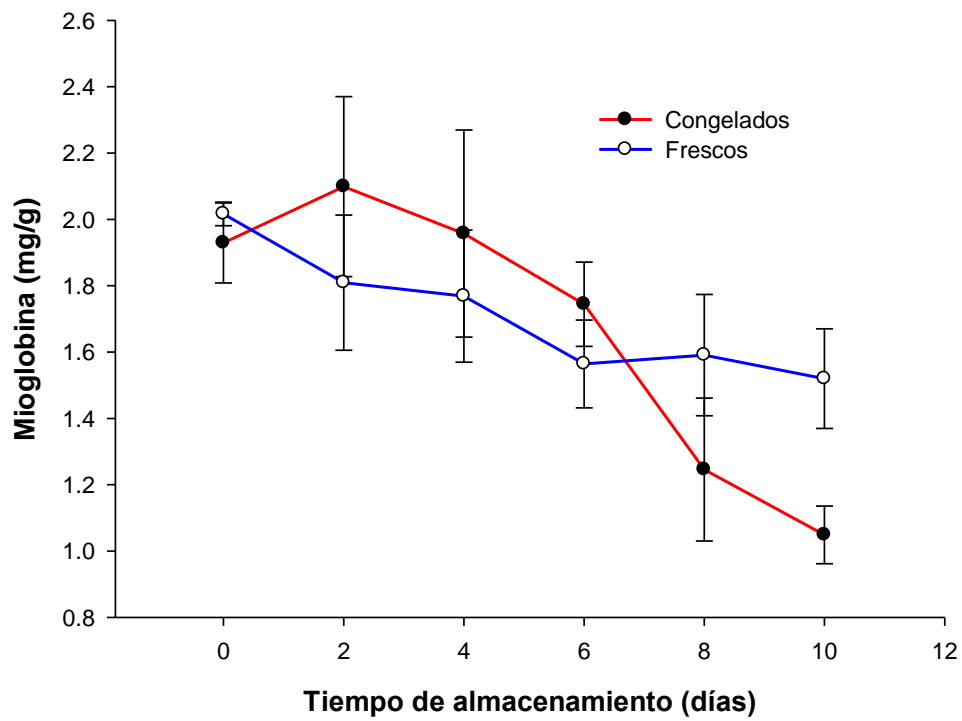
BIBLIOGRAFÍA

- Aranda IV, R., H. Cai, et al. (2009). "Structural analysis of fish versus mammalian hemoglobins: effect of the heme pocket environment on autooxidation and hemin loss." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **75**(1): 217-230.
- Baron, C. P., L. H. Skibsted, et al. (2002). "Concentration effects in myoglobin-catalyzed peroxidation of linoleate." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(4): 883-888.
- Benjakul, S. and F. Bauer (2001). "Biochemical and physicochemical changes in catfish (*Silurus glanis Linne*) muscle as influenced by different freeze-thaw cycles." Food Chemistry **72**: 207-217.
- Chaijan, M., S. Benjakul, et al. (2005). "Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage." Food Chemistry **93**(4): 607-617.
- Chaijan, M., S. Benjakul, et al. (2007). "Characterisation of myoglobin from sardine (*Sardinella gibbosa*) dark muscle." Food Chemistry **100**(1): 156-164.
- Chaijan, M., S. Benjakul, et al. (2008). "Interaction of fish myoglobin and myofibrillar proteins." Journal of Food Science **73**(5): C292-C298.
- Chen, W. E. N. L. E. E. and C. J. E. N. Chow (2001). "Studies on the physicochemical properties of milkfish myoglobin." Journal of food biochemistry **25**(2): 157-174.
- FAO (2010). "El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura." ISBN 978-92-5-306675-9.
- Faustman, C. and R. Cassens (1990). "The biochemical basis for discoloration in fresh meat: A review." Journal of Muscle Foods **1**(3): 217-243.
- Govindarajan, S. and H. Snyder (1973). "Fresh meat color." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **4**(1): 117-140.
- Hashimoto, K. (1988). "Evaluation of tuna meat discoloration by Hunter color difference scale." Nippon Suisan Gakkaishi **54**(4): 649-653.
- Hui, Y. H., N. Cross, et al. (2004). "Biochemistry of Food Processing " Food Processing Manual: 363-365.
- Humann, P. and N. Deloach (1994). Reef fish identification: Galápagos, New World Publications.
- Huss, H., T. Boerresen, et al. (1998). "Quality and quality changes in fresh fish; El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad." FAO, Documento Tecnico de Pesca (FAO).
- Kitahara, Y., A. Matsuoka, et al. (1990). "Autoxidation of myoglobin from bigeye tuna fish (*Thunnus obesus*)." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology **1038**(1): 23-28.

- Krzywicki, K. (1982). "The determination of haem pigments in meat." Meat Science **7**(1): 29-36.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature **227**(5259): 680-685.
- Mancini, R. and M. Hunt (2005). "Current research in meat color." Meat Science **71**(1): 100-121.
- Mathews, V. H., Ahern (2004). "Bioquímica " Pearson Addison Wesley.
- Matsuura, F. and K. Hashimoto (1954). "Chemical studies on the red muscle ('chiai') of fishes-II. Determinations of the content of hemoglobin, myoglobin and cytochrome c in the muscles of fishes." Nippon Suisan Gakkaishi **20**: 308-312.
- OIEDRUS (2008). "Diagnóstico Pesquero 2000-2008 de Sonora."
- Pacheco-Aguilar, R., V. M. OCAÑO HIGUERA, et al. (2003). "Changes in postmortem quality indices in finescale triggerfish muscle stored in ice." Journal of food biochemistry **27**(4): 333-352.
- Puente-Zepeda, A. (2003). "Cambios de color y textura en el músculo de cochito (*Balistes polylepis*) durante su almacenamiento en hielo a 0 °C." Tesis de maestria
- Rawdkuen, S., A. Jongjareonrak, et al. (2008). "Discoloration and lipid deterioration of farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) muscle during refrigerated storage." Journal of Food Science **73**(3): C179-C184.
- Renerre, M. (1990). "Factors involved in the discoloration of beef meat." International Journal of Food Science & Technology **25**(6): 613-630.
- Renerre, M., M. Anton, et al. (1992). "Autoxidation of purified myoglobin from two bovine muscles." Meat Science **32**(3): 331-342.
- Renerre, M. and R. Labas (1987). "Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles." Meat Science **19**(2): 151-165.
- Smulevich, G., E. Droghetti, et al. (2007). "A rapid spectroscopic method to detect the fraudulent treatment of tuna fish with carbon monoxide." Food Chemistry **101**(3): 1071-1077.
- Swatland, H. (1989). "A review of meat spectrophotometry (300 to 800 nm)." Canadian Institute of Food Science and Technology Journal **22**(4): 390-402.
- Tang, J., C. Faustman, et al. (2004). "Krzywicki revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extracts." Journal of food science **69**(9): C717-C720.
- Thiansilakul, Y., S. Benjakul, et al. (2010). "Changes in heme proteins and lipids associated with off-odour of seabass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*) during iced storage." Food Chemistry **121**(4): 1109-1119.

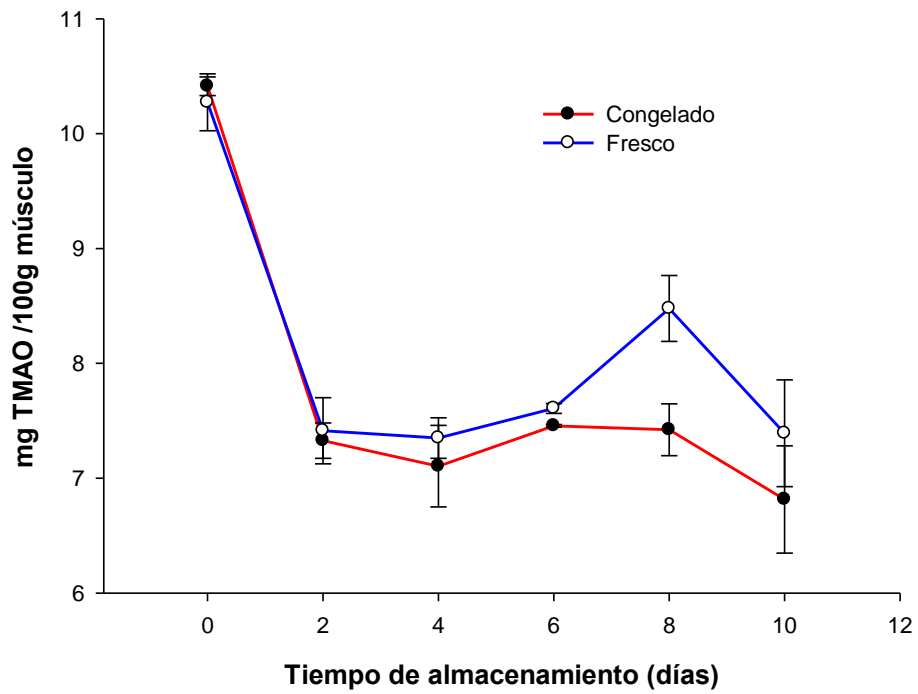
- Thiansilakul, Y., S. Benjakul, et al. (2011). "Isolation, characterisation and stability of myoglobin from Eastern little tuna (*Euthynnus affinis*) dark muscle." Food Chemistry **124**(1): 254-261.
- Ueki, N., C. Chow, et al. (2005). "Characterization of bullet tuna myoglobin with reference to the thermostability- structure relationship." J. Agric. Food Chem **53**(12): 4968-4975.
- Viriyarattanasak, C., N. Hamada-Sato, et al. (2011). "Equations for spectrophotometric determination of relative concentrations of myoglobin derivatives in aqueous tuna meat extracts." Food Chemistry.
- Yamaguchi, K., N. Takeda, et al. (1979). "Properties of mackerel and sardine myoglobins." Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries **45**.
- Yokoyama, S. (1995). "Amino acid replacements and wavelength absorption of visual pigments in vertebrates." Molecular Biology and Evolution **12**(1): 53.
- Yokoyama, S. and T. Tada (2003). "The spectral tuning in the short wavelength-sensitive type 2 pigments." Gene **306**: 91-98.

ANEXO 1



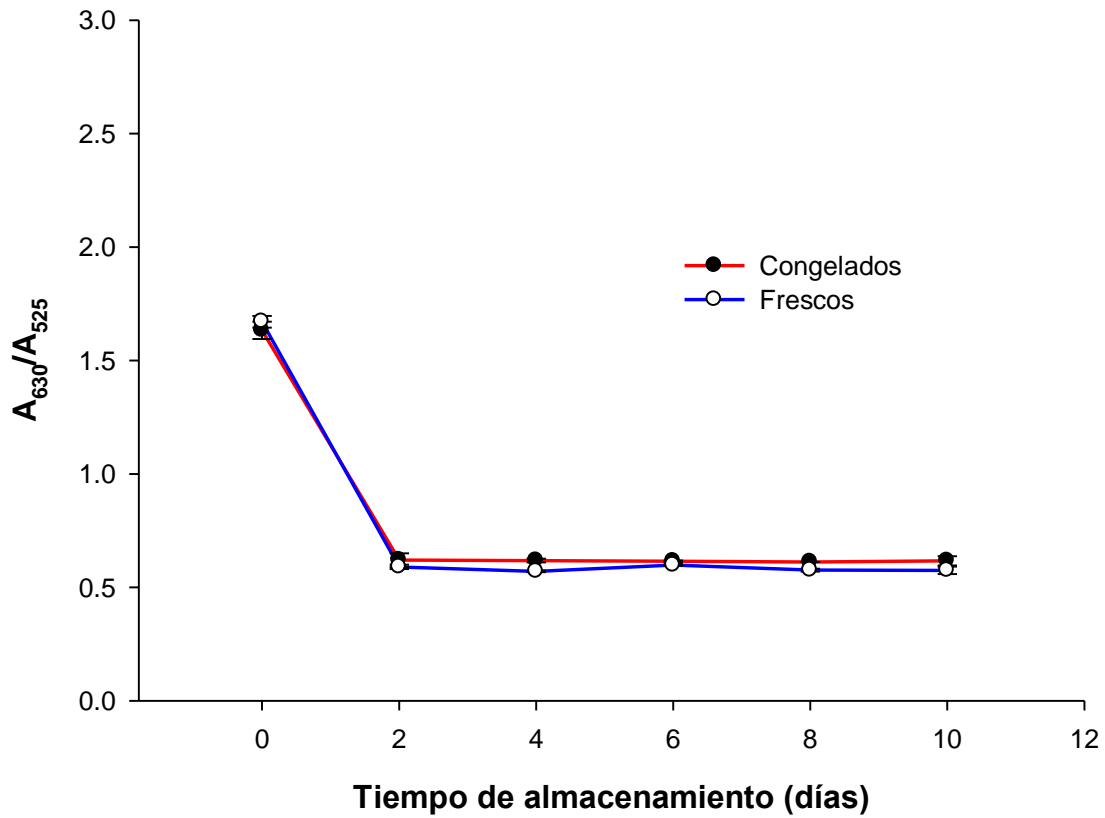
Concentración de mioglobina (mg/ g músculo) en el músculo del cochito (*Balistes polylepis*) durante su almacenamiento en hielo.

ANEXO 2



Concentración de óxido de trimetilamina (TMAO) en el músculo de cochito (*Balistes polylepis*) durante su almacenamiento en hielo.

ANEXO 3



Cambios en el contenido de metaMb (A_{630} / A_{525}) en el músculo de cochito (*Balistes polylepis*) durante su almacenamiento en hielo.