

# Efecto de la relación de dilución de los eritrocitos de la sangre de ganado bovino en la precipitación de heme por hidrólisis ácida

Guillermo Quiroga\*

Mario Velásquez\*\*1

Óscar Gómez

Édgar Pinilla

## Resumen

Se propone un proceso para la extracción y concentración de hierro contenido en el grupo heme a partir de sangre de ganado bovino. Se evaluó la hidrólisis ácida de los eritrocitos. Se utilizó un diseño completamente aleatorio de experimentos con el fin de analizar la variación de la relación de dilución de los eritrocitos en agua en la eficiencia de separación y el porcentaje de heme en el concentrado obtenido. Se estudiaron valores entre 1:1 y 1:11. La relación 1:9 presentó las mejores características: eficiencia de separación entre 51% y 61%, y 12% de heme en el concentrado. Además, se verificó la variación de pH.

**Palabras clave:** Heme – Eritrocitos – Sangre de bovino – Hidrólisis ácida.

## Summary

### Effect of the dilution factor of cattle's blood erythrocytes in the precipitation of haem by acid hydrolysis

A process for the extraction and concentration of haem iron from cattle blood was proposed. The acid hydrolysis of erythrocytes was evaluated. A totally random experimental design was used in order to analyze the variation of dilution factor of erythrocytes in water on the separation efficiency and haem percentage in the final concentrate. Dilution relations between 1:1 and 1:11 were studied. The 1:9 ratio showed the best performan-

\* Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

E-mail: gquirotg@bacata.usc.unal.edu.co

\*\* Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

1 E-mail: mvelasq@ing.unal.edu.co

ce, that is, separation efficiency between 51% and 61%, and 12 % of haem in the concentrate. Besides, the pH variation was checked.

**Key words:** Haem – Erythrocytes – Cattle blood – Acid hydrolysis.

## Introducción

La sangre de ganado bovino es un subproducto de su sacrificio. Esta es una rica fuente de proteínas y hierro contenido en el grupo heme, el cual es de alto valor biológico debido a la gran capacidad que tiene de ser absorbido en el intestino humano. Sumando a lo anterior, el hecho de que la inadecuada eliminación o procesamiento de la sangre, común en nuestro medio, genera una severa problemática ambiental; el aprovechamiento del grupo heme como fuente de hierro nutricional se presenta como una alternativa integral para hacer frente a la deficiencia de este micronutriente en la población mundial, como lo reportan diversas organizaciones internacionales entre las que se encuentran la FAO, la OMS, UNICEF, y en el ámbito local, el Instituto Nacional de Salud y el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, ICBF.

El uso de la sangre con este enfoque ha sido reportado por diversos autores entre los que se encuentran Lindroos [1978, 1984] (1, 2), Luijerink [1982] (3), Eriksson [1983] (4), Autio [1984, 1985] (5, 6), y Luck [2001] (7), quienes coinciden en la implementación de las etapas básicas del proceso, pero aplican diversas condiciones de operación o incluyen otras materias primas en el proceso, tales como solventes y agentes aglomerantes, con el fin de mejorar la separación y la purificación del grupo heme de la hemoglobina, aunque afecten la economía del proceso. Sin embargo, dentro de la literatura mundial se ha escrito más acerca del aprovechamiento de la proteína del plasma y de la presente en los eritrocitos (8-12), buscando su decoloración y desodorización para incrementar su uso en la industria de alimentos.

La presente investigación busca sentar las bases de un proceso para llegar a la utilización masiva del hierro contenido en el grupo heme concentrado como fortificante en nutrición humana, sin precedente encontrado en la literatura nacional, y contribuir a la búsqueda de alternativas a la problemática ambiental de las plantas de beneficio de animales para consumo humano en el país. De una serie de etapas que estructuraron el proceso base, se seleccionó la principal para ser evaluada. Todo esto con miras a contribuir en el desarrollo de productos que sean nuevas fuentes de hierro, más asimilables por el cuerpo humano y además, asequibles, para su uso en programas de fortificación de alimentos (13-17).

## Metodología

Se plantearon unas etapas básicas del proceso para la extracción de un concentrado del hierro contenido en el grupo heme a partir de sangre de ganado bovino las cuales consisten en:

- Recolección de la sangre en el proceso de sacrificio del animal.
- Estabilización de la sangre con un anti-coagulante.
- Centrifugación de la sangre con el fin de separar el plasma de la fracción corpuscular.
- Ruptura o lisis de los eritrocitos presentes en la fracción corpuscular.
- Hidrólisis ácida.
- Centrifugación del hidrolizado con el fin de separar el concentrado de hierro hemático.

La fracción corpuscular de sangre fresca de ganado bovino fue suministrada por un distribuidor local de plasma, que lo separa a partir de

sangre recolectada en una planta de beneficio de animales de la ciudad, donde es estabilizada con citrato de sodio (18, 19).

La hidrólisis ácida se realizó en un erlenmeyer con 100 g de eritrocitos, adicionando luego agua destilada hasta la relación de dilución propuesta, y ajustando el pH con ácido clorhídrico 1N. Las condiciones de la hidrólisis fueron las siguientes: pH fijo inicialmente a 1.5, temperatura de 20°C, velocidad de agitación de 200 rpm, durante una hora, y posterior centrifugación a 3300 g por 15 minutos. Se evaluó el efecto de la relación de dilución en la precipitación del grupo heme, haciendo hidrólisis con valores de 1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, y 1:11. Además, se verificó la significancia del cambio del pH final. Se realizó un diseño completamente aleatorio de experimentos (20).

La eficiencia de separación (EF) se calculó como:

$$EF = \frac{\%Fe_{HIC} \times M_{HIC}}{\%Fe_c \times M_c} \times 100$$

Donde  $\%Fe_{HIC}$  y  $\%Fe_c$  es el porcentaje de hierro en el concentrado de hierro y en los eritrocitos respectivamente, y  $M_{HIC}$  y  $M_c$  es la masa de concentrado obtenido y de eritrocitos utilizados. El porcentaje de hierro fue medido por absorción atómica en un Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer Analyst 300.

La pureza (P) se calculó como:

$$P = \frac{\%Fe_{HIC}}{\%sol \times 9.06 \times 10^{-2}} \times 100$$

Donde  $\%sol$  es el porcentaje de sólidos del concentrado de hierro heme obtenido. Este porcentaje se determinó con base en el método AOAC 24.061 (21).

Se verificó la naturaleza hemática del hierro medido por absorción atómica para el mejor ensayo empleando la metodología descrita por Hornsey [1956] (22).

El hierro heme fue determinado por extracción ácido – acetónica de muestras por el método de Hornsey [1956]. Alícuotas de aproximadamente 10 g se mezclaron con 45 mililitros de solución ácido – acetónica (40 mL de acetona, 4 mL de agua y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado), se hizo una buena mezcla y se mantuvo en oscuridad por 1 hora. El extracto se centrifugó a 2200 G a 10°C por 10 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros de microfibras de vidrio (Whatman GF / D), con el propósito de asegurar el retiro de cualquier contaminante proteico coagulado, no separado en la centrifugación. Esto resultó en una solución de hematina ácida en 80% de solución ácido – acetónica. La cantidad total de pigmento heme se midió a 640 nm. El total de heme como hematina en cada muestra se calculó como sigue a continuación:

Hematina, g = OD a 640 nm x 680 x peso de la alícuota, g / 10.

El contenido de hierro heme de cada muestra se calculó asumiendo que un gramo de hematina contiene 88.2 mg de hierro:

Hierro heme,  $\mu\text{g/g}$  = (hematina, g x 88.2 mg Fe / g) / peso de la alícuota, g.

## Resultados y discusión

El resultado del análisis de varianza se presenta en las Tablas 1, 2 y 3. En las Tablas 1 y 2 se nota el efecto de la relación de dilución sobre la

**Tabla 1.** Resultados del análisis estadístico del efecto de la relación de dilución en la hidrólisis ácida, respecto a la eficiencia de separación (EF).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Fc
Relación de Dilución	4	371.3	22.20

Significante  $P < 0.05$ .

**Tabla 2.** Resultados del análisis estadístico del efecto de la relación de dilución en la hidrólisis ácida, respecto a la pureza (P).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Fc
Relación de Dilución	4	371.3	22.20

Significante  $P < 0.05$ .

eficiencia de la separación y, por lo tanto, sobre la concentración final de hierro.

En la Tabla 3 se verifica la nula influencia de la variación del pH a lo largo de la experimentación sobre las distintas eficiencias obtenidas.

**Tabla 3.** Resultados del análisis estadístico del efecto del pH en la hidrólisis ácida, respecto a la eficiencia de separación (EF).

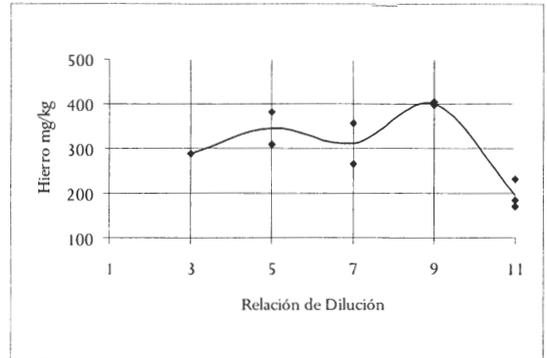
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Fc
pH	4	204.1	1.59

Significante  $P < 0.05$ .

La primera relación de dilución, 1:1, se descartó después del primer ensayo debido a la imposibilidad de separar la mezcla en dos fases. La posible causa de este fenómeno es que la ruptura del eritrocito, en una dilución pequeña, permite que la globina desarrolle su inherente capacidad tensioactiva, de manera que la agitación incorpora aire en la dilución formando una espuma uniforme. Después de la operación de centrifugación, a partir de la relación 1:7, la separación de las dos fases fue marcada. Las relaciones 1:3 y 1:5 no presentaban una interfase bien definida; sin embargo, los datos fueron usados en el análisis de la presente investigación.

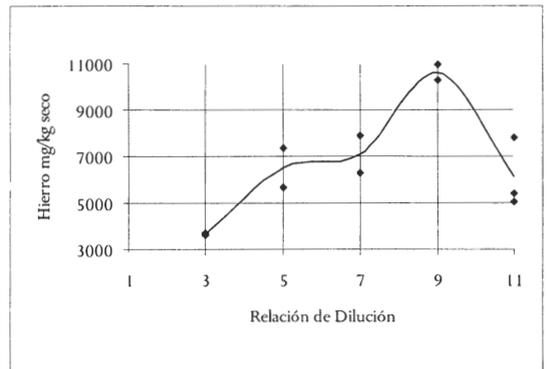
Se comparó la cantidad de hierro presente en el concentrado, dentro de cada uno de los

ensayos de dilución. La Figura 1 presenta el resultado de la experimentación.



**Figura 1.** Variación del contenido de hierro el concentrado respecto a la relación de dilución.

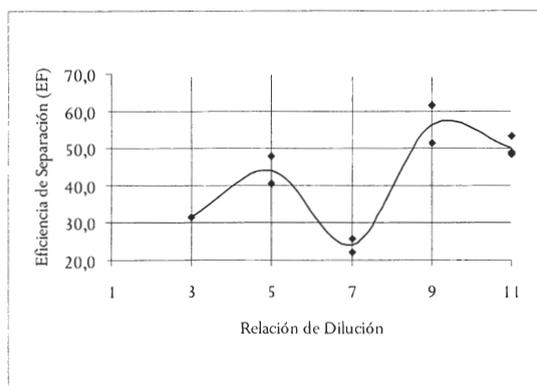
El primer pico de la gráfica puede ser atribuido a la dificultad en la diferenciación de las fases, aunque las concentraciones de hierro de la fase 1:5 y la fase 1:7 son muy similares. El segundo pico corresponde a la relación 1:9, y este se acentúa más cuando se comparan los valores en base seca, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Variación del contenido de hierro en el concentrado respecto a la relación de dilución.

La existencia del máximo puede ser explicada como la compensación de dos factores que influyen de manera contraria en la separación y concentración del hierro hemático: la

concentración de globina en solución que, como se observó más drásticamente en el ensayo 1:1, modifica las condiciones reológicas de la solución dificultando la separación de fases; contra la cantidad de solvente utilizada, que a medida que aumenta distancia más entre si las moléculas de heme, de manera que la aglomeración, responsable de la separación de las fases, se hace más difícil. Los resultados de la eficiencia de separación respecto a la relación de dilución se muestran en la Figura 3.



**Figura 3.** Variación de la eficiencia de la separación (EF) respecto a la relación de dilución.

La eficiencia alcanzada en la separación es muy similar a la reportada por los distintos autores, como se puede ver en la Tabla 4. Sin embargo, la pureza lograda se encuentra por debajo de las obtenidas por ellos. Esto se debe a

**Tabla 4.** Comparación de la pureza y eficiencia de separación de distintos procesos de concentración de hierro heme.

	% Fe heme seco	Pureza (P)	(EF)
<b>Obtenido</b>	1.09	12	51-61
Luck et al. [2001]	2.73 - 3.64	40	55-70
Lindroos [1978]	0.45	5	--
Lindroos [1984]	1.36 - 5.00	15-55	65-85
Eriksson [1983]	4.91	54	--

la ausencia de etapas específicas de purificación.

Por último, la verificación del estado del hierro arrojó resultados positivos, ya que los porcentajes de hierro medidos por ambos procedimientos fueron similares tanto para los eritrocitos, como para el concentrado obtenido del ensayo usando la relación 1:9 de dilución. La comparación de estos valores se presenta en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Valores de hierro total y hierro heme para los eritrocitos y concentrado obtenido usando la relación 1:9.

	% Fe total	% Fe Heme
Eritrocitos	0.0841	0.0839
Concentrado del ensayo a 1:9	0.0404	0.0401

## Conclusiones

La relación de dilución resultó ser un factor de gran importancia en la eficiencia de la separación del hierro y en la concentración de la fase pesada obtenida. Se deben trabajar valores desde 1:7 para compensar el efecto de la globina liberada en la naturaleza de la mezcla.

La mejor eficiencia de separación del hierro se obtuvo utilizando una relación 1:9 de dilución de eritrocitos en solución de ácido clorhídrico. Se alcanzó una eficiencia máxima del 61,4% con una pureza de heme en base seca de 12%. El uso de relaciones de dilución mayores baja el rendimiento por la cantidad de agua incorporada y la separación que inherentemente provoca entre las moléculas de heme, dificultando su aglomeración y posterior precipitación.

La variación en el pH de la hidrólisis demostró no ser influyente dentro del intervalo permitido, ni dañar la naturaleza proteica del hierro contenido en el grupo heme.

## Agradecimientos

Se agradece a la División de Investigaciones de la sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, al Departamento de Nutrición y Dietética de la Facultad de Medicina de la misma, y a la empresa Plasmaliq Ltda., por el apoyo para la realización del presente trabajo.

## Bibliografía

1. P. Lindroos, Heme concentrate and method for the preparation thereof, US Patent N° 4,431,581. Feb. 14 (1984).
2. P. Lindroos, Method of treating liquids containing blood substances, US Patent N° 4,098,780. Jul. 4 (1978).
3. J. Luijterink, Process of preparing blood cell protein from hemoglobin, US Patent N° 4,330,463. May 18 (1982).
4. C. Eriksson, Heme-iron-enriched amino acid and a process for the preparation of heme-iron-enriched amino acid, US Patent N° 4,411,915. Oct. 25 (1983).
5. K. Autio, M. Kiesvaara, Y. Malkki y S. Kanko, Chemical and functional properties of blood globin prepared by a new method, *J. Food Science*, **49**, 859 (1984).
6. K. Autio, M. Kiesvaara y Y. Malkki, Method for dividing blood hemoglobin into heme and globin, US Patent N° 4,518,525. May. 21 (1985).
7. T. Luck y A. Maurer, Method of obtaining haemin from slaughter blood, US Patent N° 6,217,932. Apr. 17 (2001).
8. Y. Sato y S. Hayakawa, Method of separating globin, US Patent N° 4,376,727. Mar. 15 (1983).
9. H. Schultze, Isolation and purification of hemin, US Patent N° 4,761,472. Aug. 2 (1988).
10. P. Tybor, C. Dill y W. Landmann, Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process, *J. Food Science*, **40**, 155 (1975).
11. J. Toikka, Process for the purification of hemin, a novel derivative and process for its preparation, US Patent N° 5,233,034. Aug. 3 (1993).
12. J. Wismer-Pedersen y J. Frohlich, Process for producing a substantially heme-free blood protein. US Patent N° 5,151,500. Sep. 29 (1992).
13. J. Asenjo, M. Amar, N. Cartagena, J. King, E. Hiche y A. Stekel, Use of a bovine heme iron concentrate in the fortification of biscuits, *J. Food Science*, **50**, 795 (1985).
14. R. Duarte, M. Carvalho y V. Sgarbieri, Bovine blood components: Fractionation, composition, and nutritive value, *J. Agricult. Food Chem.*, **47**, 231 (1999).
15. V. Hald-Christensen, J. Adler y H. Olsen, Method for preparing a food material from blood, US Patent N° 4, 262, 022. Apr. 14 (1981).
16. O. Jansuittivechakul, A. Mahoney, D. Cornforth, D. Hendricks y K. Kangsadalampi, Effect of heat treatment on bioavailability of meat and hemoglobin iron fed to anemic rats, *J. Food Science*, **50**, 407 (1985).
17. K. Schumann y A. Maurer, Abattoir blood used in foods: an example of nutrition-environment interaction, *SCN News*, 21 (2000).
18. S. Divakaran, "Animal Blood Processing and Utilization: FAO Agricultural, Service Bulletin", 32, Roma, 1982.
19. H. Ockerman, "Industrialización de Subproductos de Origen Animal", Ed. Acribia, Zaragoza, 1984.

20. R. Martínez, y N. Martínez, "Diseño Experimental: Análisis de Datos Estándar y no Estándar", Fondo Nacional Universitario, Santafé de Bogotá, 1997.
21. AOAC. Association of Official Analytical Chemists, "Official Methods of Analysis", Edición 13, Washington: AOAC, 1980.
22. H. Hornsey, The colour of cooked cured pork. I Estimation of the nitric oxide-haem pigments, *J. Science Food Agricult.*, **7**, 534 (1956).