

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO CLÁSICO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIERRO HEMO EN CARNE VACUNA

OPTIMIZATION OF A CLASSIC SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF HEME IRON IN BEEF

**Valery Bühl*¹, Analía Suárez¹, Luis Panizzolo², Carlos Méndez³,
Marcelo Cerminara⁴, Mariela Pistón*¹**

Universidad de la República, Facultad de Química, (1) Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica, (2) Área Química de Alimentos Av. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo - Uruguay

(3) Instituto Nacional de Carnes, Gerencia de Contralor, Área de Inocuidad, Rincón 545, Montevideo - Uruguay

(4) Universidad de la República, Facultad de Ingeniería, Instituto de Matemática y Estadística, Av. Julio Herrera y Reissig 565, Montevideo - Uruguay

*autor de contacto (e-mail: vbuhl@fq.edu.uy; mpiston@fq.edu.uy)

Recibido: 14/01/2019 - Evaluado: 21/02/2019 - Aceptado: 28/03/2019

RESUMEN

Este trabajo describe la optimización de un método espectrofotométrico clásico ("método Hornsey") para determinar hierro hemo en carnes. Este método extrae hierro hemo de la carne mediante agitación con acetona ácida, maceración en la oscuridad y determinación espectrofotométrica a 640nm sobre el filtrado. Es ampliamente utilizado, pero su descripción original no detalla la influencia de algunas variables. En numerosos trabajos se determina hierro hemo según el "método Hornsey" utilizando diferentes estrategias de agitación y tiempos de incubación diversos. Estas variables se optimizaron mediante un diseño multivariado de tipo central compuesto. Con el método optimizado se analizaron distintos cortes de carne vacuna para evaluar su valor nutricional en cuanto a niveles de hierro biodisponible. A partir de una optimización racional, se obtuvieron las condiciones experimentales adecuadas para realizar un método analítico, considerado de referencia, de forma sistemática y protocolizada en los laboratorios para evaluar el contenido de hierro hemo en carnes.

ABSTRACT

This work describes the optimization of a classical spectrophotometric method ("Hornsey's method") for the determination of heme iron in beef. This method extracts heme iron from meat by stirring with acid acetone, maceration in the dark and subsequent spectrophotometric determination at 640 nm over the filtrate. It is widely used, however, in the original description details about the influence of some variables are not explained. Numerous studies mentioning the determination of heme iron according to "Hornsey's method" use different stirring strategies and incubation times. These variables were optimized through a multivariate design of a central composite type. The optimized method was applied to analyze different beef cuts to evaluate their nutritional value in terms of bioavailable iron levels. From a rational optimization, the appropriate experimental conditions were obtained to perform an analytical method, considered as a reference, in a systematic and protocolized way in the laboratories to evaluate the content of heme iron in meats.

Palabras clave: hierro hemo, carne bovina, optimización, diseño experimental multivariado
Keywords: heme iron, beef, multivariate experimental designs, optimization Hornsey's method

INTRODUCCIÓN

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para los seres vivos, interviene en el crecimiento, el desarrollo neurocognitivo y el funcionamiento del sistema inmunológico. Participa en la síntesis de hemoglobina, mioglobina y ciertas enzimas.

Es de destacar que existe una enfermedad que se produce por deficiencia de Fe, la anemia ferropénica. Esta enfermedad es el trastorno nutricional más común y extendido en todo el planeta. Se trata de la única enfermedad carencial que además de afectar a la salud de gran número de niños y mujeres de los países en desarrollo, es también muy prevalente en los países industrializados (Haas & Brownlie, 2001; Grantham & Ani, 2001; OMS, 2018). Latinoamérica no es ajeno a esta problemática (Assandri *et al.*, 2018).

Los seres humanos obtienen los requerimientos necesarios de este elemento por medio de la dieta. El Fe está presente en los alimentos en dos formas químicas diferentes: hemo y no hemo.

Las carnes rojas, las carnes de ave y de los peces contienen Fe en la forma hemo y no hemo (Urdampilleta *et al.*, 2010). La cantidad de Fe absorbida depende de estas diferentes formas químicas (hemo o no hemo) siendo mucho mayor la absorción de la forma hemo (20-30 %) con respecto a la no hemo (1-20 %) (Forrellat *et al.*, 2000; Kalpalathika *et al.*, 1991). La carne vacuna es una fuente de hierro hemo para la dieta.

Diversos estudios han demostrado que cocinar, congelar, congelar-descongelar y almacenar carnes, disminuye el contenido de hierro hemo y aumenta el no hemo.

Uruguay es uno de los países donde más carne se consume en el mundo, en particular carne bovina ubicándose en el segundo puesto del ranking mundial con 59,2 kg de carne/habitante/año. Según las últimas estadísticas publicadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC) el 85% de las exportaciones de carnes de nuestro país corresponden a carne bovina (INAC, 2017).

El objetivo de este trabajo fue optimizar un método para la determinación de Fe hemo y luego aplicarlo para la determinación en tres cortes de carnes de consumo popular en Uruguay, con el objetivo de evaluar si existen diferencias significativas en los niveles de Fe hemo entre los cortes. Además, considerando que la carne se consume cocida, esta comparación se realiza sobre muestras sometidas a un proceso de cocción.

MATERIALES Y METODOS

Se tomó como base el método empírico de Hornsey, que realiza la determinación mediante espectrometría de absorción molecular a 640 nm. Hornsey empleó una disolución de acetona al 80% acidificada para convertir la mioglobina y hemoglobina en ácido hematinico (Hornsey, 1956).

El método original consiste en picar finamente 10 g de carne, agitar y dejar macerar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos, con 50 mL de acetona acidificada (acetona:agua destilada:HCl concentrado (90:8:2)), se filtra y se mide la absorbancia en una celda de vidrio de 1,00 cm de camino óptico a 640 nm. En estas condiciones se obtienen los pigmentos totales en la carne como hematina, multiplicando por un factor de 680 se obtiene la concentración total de pigmentos totales en la carne expresado en ppm de hematina. Para obtener el contenido de Fe hemo (mg kg^{-1}) se divide entre la masa pesada y se multiplica por un factor de 0,0882.

Los factores utilizados, provienen del trabajo de Hornsey, siendo $A_{640} = abC$, donde A_{640} es la absorbancia de la muestra, **a** es la absorptividad, **b** el camino óptico (1cm) y **C** la concentración de la solución absorbente (en mol L^{-1}). La absorptividad es una constante que depende de la longitud de onda y de la naturaleza de la sustancia y el peso fórmula (PF) del material absorbente. La absorptividad milimolar (ϵ) es el producto de la absorptividad y

el peso fórmula, siendo ϵ_{640} del Fe hemo, en acetona ácida, según condiciones de Hornsey $4,8 \text{ Lcm}^{-1}\text{mmol}^{-1}$. Considerando que se utilizan 2 g de muestra, 10 mL de disolvente (factor de dilución es 5) y que el PF de la hematina ácida es $652,2 \text{ g mol}^{-1}$.

Sustituyendo: **C** pigmentos totales (mg kg^{-1}) en la carne como hematina = $A_{640} \times 5 \times 652,2 / 4,8$ se obtiene que $C = A_{640} \times 680$ (estrictamente 679,17, pero se suele utilizar 680). El factor de 0,0882 surge de la relación PA_{Fe} ($55,845 \text{ g mol}^{-1}$) / PF_{hematina} ($633,49 \text{ g mol}^{-1}$). Así el Fe hemínico es calculado como: $\text{Fe hemínico} (\text{mg kg}^{-1}) = \text{pigmentos totales} \times 0,0882$.

El método de desarrollado por Hornsey sigue siendo al día de hoy, el más reportado para la determinación de Fe hemo en carnes (Hornsey, 1956; Lee *et al.*, 1998; Lombardi-Boccia *et al.*, 2002; Purchas *et al.*, 2003; Pourkhalili *et al.*, 2013; Pretorius *et al.*, 2016), sin embargo en la descripción original y en la literatura no se describen detalles sobre la influencia de la agitación ni el tiempo de incubación, por lo que aparecen numerosos trabajos que mencionan realizar la determinación de Fe hemo según el "método Hornsey" pero con diferentes estrategias de agitación y tiempos de incubación diversos.

Debido a que la matriz carne es muy heterogénea dependiendo del tipo de corte, los métodos analíticos deben ser optimizados de forma tal de obtener resultados confiables considerando diferentes variables. Para ello se recurre a diseños experimentales multivariados de forma de obtener los mejores resultados en términos de parámetros de desempeño de los métodos con el menor número de experimentos. A partir de este trabajo se establece un procedimiento normalizado para esta determinación analítica.

El método optimizado se aplicó a muestras de carne vacuna en tres cortes diferentes (asado, cuadril y bola de lomo). Las muestras se analizaron crudas y cocidas. Los resultados obtenidos permiten evaluar el valor nutricional de los cortes desde el punto de vista del contenido de Fe en su forma biodisponible.

Las muestras de carne analizadas fueron de 20 animales (cada muestra de un animal diferente de entre 25 y 50 meses de edad de las razas Aberdeen Angus y Hereford) y de cada uno se analizaron 3 cortes, crudos y cocidos. Los cortes seleccionados fueron asado, cuadril y bola de lomo (Figura 1). La selección se realizó teniendo en cuenta que estos cortes son los de mayor consumo en Uruguay.

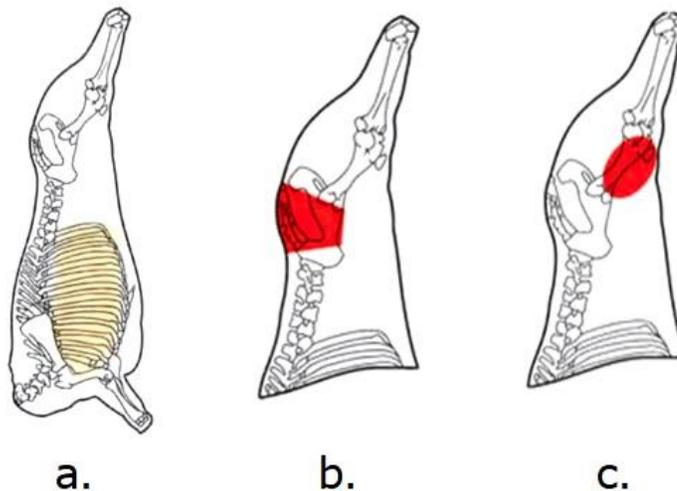


Fig. 1: a. asado; b. cuadril; c. bola de lomo

Estas muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC), las mismas fueron recibidas envasadas al vacío. Aproximadamente 100 g de cada corte (asado, cuadril y bola de lomo), se desgrasaron, deshuesaron (en el caso del asado) y se trituraron con molino de cuchillas.

Se conservaron en freezer (-18°C) hasta el momento del análisis. Las cocciones se realizaron en plancha primeramente calentada a 300°C (sellado rápido alcanzando el centro del corte 42°C) y posteriormente se culminó la cocción en horno a 270 °C (hasta alcanzar una temperatura en el centro del corte de 82-85 °C). La pérdida de masa de los cortes cocidos fue de entre 31 y 33 %. Se trató de reproducir condiciones para todos los cortes realizando un procedimiento de cocción similar a como se cocina la carne en restaurantes de nuestro país.

La humedad de las muestras se determinó mediante el método de la AOAC 950.46 B (AOAC, 2005).

Todos los materiales fueron sumergidos en ácido nítrico 10% v/v durante toda la noche y luego enjuagado con agua ultrapura. El agua ultrapura de (ASTM Tipo I, 18,2 MΩcm de resistividad) fue obtenida mediante un purificador Millipore Simplicity 185. Ácido clorhídrico concentrado, 37% m/v (Merck). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. La acetona ácida: se preparó en las siguientes proporciones acetona (9): agua (0,8): HCl concentrado (0,2).

Se pesan de 2,0000 g de muestra de carne finamente picada en un tubo cónico de 50 mL (tipo Falcon®) y se agregan 10,00 mL de acetona ácida. Se agita en un agitador orbital (Daihan Sho-2D) a 200 rpm, se mantiene en oscuridad y luego se filtra por filtro Whatman No. 2. Las determinaciones analíticas se realizaron a 640 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Hewlett Packard 8453.

Se realizó un diseño experimental multivariado de tipo central compuesto de 2 variables en 5 niveles (Massart *et al.*, 1998). Las variables consideradas para la optimización fueron el tiempo de agitación y el tiempo de maceración según se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Variables y niveles ensayados en los experimentos de optimización.

Variable	Niveles				
tiempo de agitación (s)	5	15	30	45	60
tiempo de incubación (min)	15	30	45	60	75

Tabla 2. Resultados obtenidos luego de realizar un diseño experimental central compuesto (2 variables, 5 niveles)

Nº de Experimento	Agitación (s)	Tiempo de maceración (min)	Respuesta Fe hemo (mg kg ⁻¹) *
1	5	45	13,50 ± 0,80
2	15	30	10,21 ± 0,72
3	15	60	13,36 ± 0,99
4	30	15	7,64 ± 0,18
5	30	45	16,10 ± 0,72
6	30	75	14,54 ± 0,24
7	45	30	11,88 ± 0,94
8	45	60	13,20 ± 0,72
9	60	45	14,40 ± 0,92

*Respuesta= promedio (n=2) ± s (desviación estándar)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se presentan los experimentos realizados y las respuestas obtenidas. Se consideró como respuesta a evaluar la concentración de Fe hemo obtenida luego de realizar cada experimento.

En la figura 2 se muestra la superficie de respuesta generada a partir de los experimentos realizados utilizando el software *Statistica*® a partir de esta representación se pueden predecir las condiciones óptimas para las variables estudiadas.

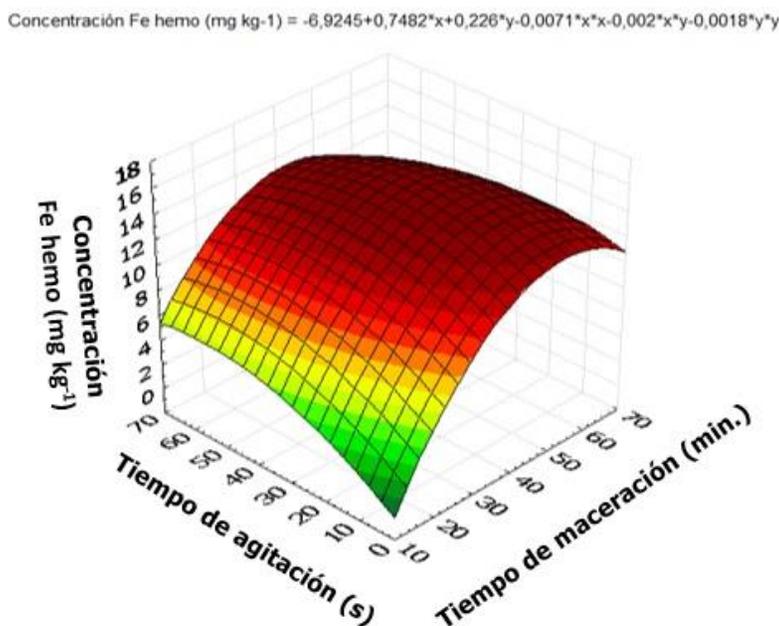


Fig. 2: Superficie de respuesta para las variables en estudio

Según los resultados obtenidos, las mejores condiciones fueron: tiempo de agitación entre 30 y 40 segundos y un tiempo de incubación de 45 minutos. Con una máxima respuesta para el experimento 5 (tabla 2).

La optimización realizada confirmó que el tiempo de maceración en la oscuridad reportado en la publicación original de Hornsey, es adecuado (se encuentra dentro del rango óptimo), sin embargo, se puede realizar también con muy buenos resultados con un tiempo de 45 minutos. Además, se pudo verificar que una agitación sistemática en el rango de 30 a 40 s produce resultados reproducibles, el método original no menciona ningún detalle sobre esta operación y según este estudio no parece tener mayor relevancia en la respuesta del método concluyéndose que la variable de mayor influencia y crítica es el tiempo de maceración. Por otra parte, el método se puede realizar con menor cantidad de muestra y volumen de disolvente (manteniendo las proporciones entre ambos). La precisión en todos los casos fue mejor que 10 % (expresada como desviación estándar relativa, RSD %).

Una vez optimizado el método se aplicó a la determinación de Fe hemo a los tres cortes antes mencionados. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

En la Figura 3 se muestran las concentraciones promedio obtenidas de Fe hemo, expresados en mg kg⁻¹ y en base seca para poder comparar los valores entre las diferentes muestras.

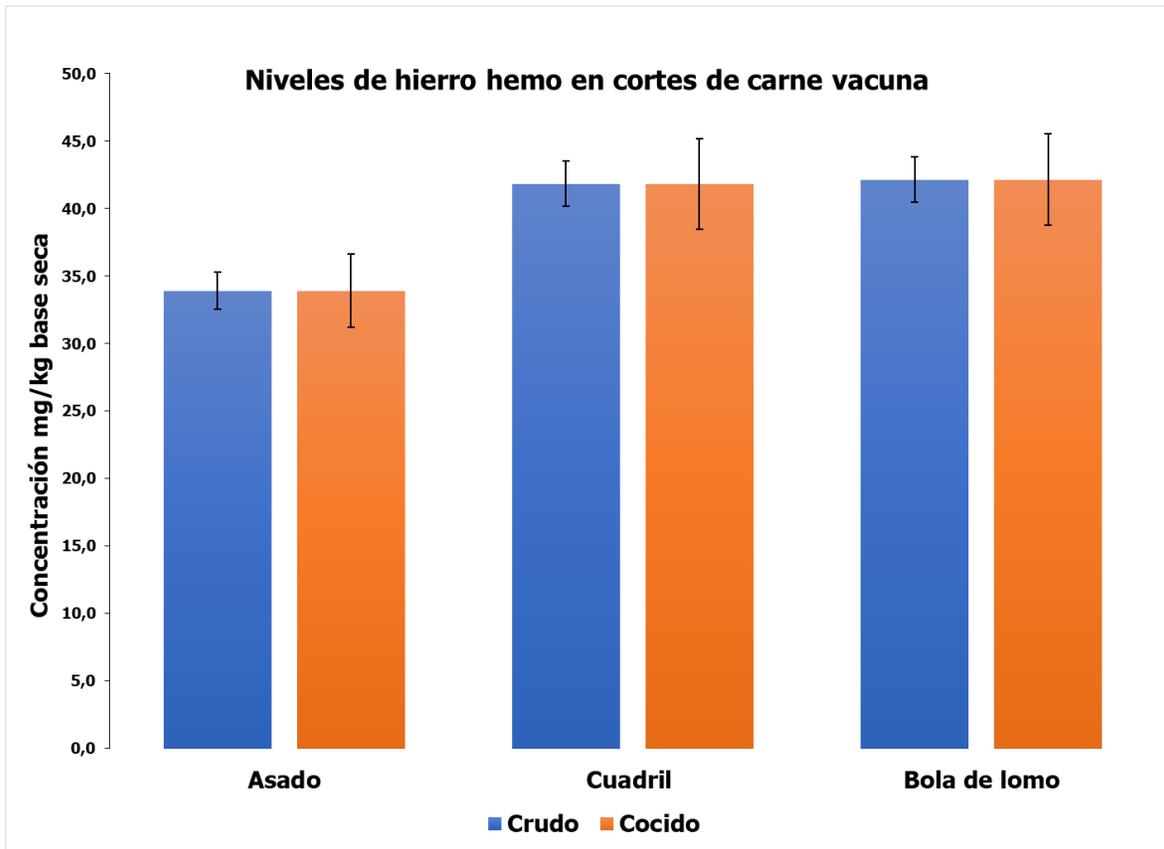


Fig. 3: Niveles de Fe hemo en cortes de asado, cuadril y bola de lomo de carne vacuna uruguaya (n=20)

El contenido de Fe total fue determinado en estas muestras mediante espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS). El contenido de Fe-hemo respecto al contenido total estuvo entre un (75 – 98) %, lo cual concuerda con la literatura y con el hecho de que la carne vacuna es una fuente de importante de Fe bioaccesible para la dieta (Lombardi-Boccia, 2002; Pretorius, 2016).

Como se puede observar los cortes cuadril y bola de lomo presentan mayores niveles de Fe hemo, esto es esperable considerando que contienen mayor nivel de grasa que los otros cortes por lo que su valor nutricional en términos de contenido de Fe biodisponible es menor.

En cuanto a la variación del contenido de Fe hemo en carnes crudas y cocidas es de esperar una disminución del mismo debido al proceso de calentamiento, esto se observa en el caso del asado. Sin embargo, para los demás cortes, en las muestras analizadas, no se observó una pérdida significativa de Fe hemo. Cabe mencionar que el punto de cocción considerado es un punto que los consumidores suelen llamar "muy cocido" o "bien pasado" por lo cual se realizó el estudio en condiciones que podrían considerarse extremas. Esto podría indicar que una cocción aún en un punto muy cocido no disminuye en forma significativa el contenido de este nutriente.

Este tipo de estudios resulta de utilidad para evaluar el valor nutricional de alimentos utilizando un método analítico optimizado y normalizado para ser utilizado en forma rutinaria y sistemática.

CONCLUSIONES

Se optimizó de forma racional un método analítico clásico, ampliamente referenciado, explorando las variables de influencia y se obtuvo un procedimiento simple y sistematizado para ser utilizado de forma rutinaria para la evaluación del contenido de Fe hemo en carne vacuna.

En las muestras analizadas en las que se aplicó el método optimizado se encontró que los cortes cuadril y bola de lomo (cortes sin hueso y de bajo contenido graso) contienen niveles mayores de Fe biodisponible (Fe hemo) que el corte de asado, uno de los de consumo más popular en Uruguay. Además, en los cortes cocidos de cuadril y bola de lomo el contenido de Fe hemo se mantiene sin diferencias significativas respecto a los cortes crudos.

AGRADECIMIENTOS

A las agencias financiadoras Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), PEDECIBA-Química. Al Instituto Nacional de Carnes (INAC) – Gerencia de Contralor. Al Frigorífico Pando – Ontilcor S.A por proporcionar las muestras y al Dr. Juan Burghi (INAC) y la Ing. Paz Xavier (INAC) por su colaboración en la obtención de las muestras.

REFERENCIAS

A.O.A.C. (2005), "Official methods of analysis". Association of Official Analytical Chemists (N° 950.46 B). William Horwitz (ed). 13a ed. Washington.

Assandri, E., Skapino, E., Da Rosa, D., Alemán, A. & Acuña, A.M. (2018). Anemia, estado nutricional y parasitosis intestinales en niños pertenecientes a hogares vulnerables de Montevideo. *Arch. Pediatr Urug*, 89 (2), 86-98.

Grantham, S. & Ani, C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency and cognitive development in children. *J. Nutr*, 131 (2), 649S-668S.

Forrellat, M., Gautier du Défaix, H. & Fernández, N. (2000). Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 16 (3), 149-160.

Haas, J. & Brownlie, T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J. Nutr*, 131 (2S-2), 676S- 690S.

Hornsey, H.C. (1956). The color of cooked cured pork, I. Estimation of the nitric oxide-heme pigments. *J. Sci. Food Agric.*, 7, 534–540.

INAC (2017). Principales Indicadores y determinantes del consumo de carnes - Cierre 2017. Recuperado, febrero 22, 2019, de Instituto Nacional de Carnes, Montevideo, Uruguay. Sitio web: <https://www.inac.uy/innovaportal/file/16196/1/informe-consumo-de-carnes-mercado-domestico---cierre-2017-vf.pdf>

Kalpalathika, P.V.M., Clark, E.M. & Mahoney, A.W. (1991). Heme iron content in selected ready-to-serve beef products. *J. Agric. Food Chem.*, 39 (6), 1091–1093.

Lee, B.J., Hendricks, D.G. & Cornforth, D.P. (1998). Antioxidant Effects of Carnosine and Phytic Acid in a Model Beef System. *J. Food Sci.*, 63 (3), 394-398.

Lombardi-Boccia, G., Martínez-Domínguez, B., Aguzzia, A. & Rincón-León, F. (2002). Optimization of heme iron analysis in raw and cooked red meat. *Food Chem*, 78, 505-510.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers-Verbeke, J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Volumen 20. Part A., Capítulo 24, pp. 701-737. Amsterdam: Elsevier Science.

OMS (2018). Carencia de micronutrientes. Recuperado, febrero 18, 2019, de Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. Sitio web: <https://www.who.int/nutrition/topics/ida/es/>

Pourkhalili, A., Mirlohi, M. & Rahimi, E. (2013). Heme Iron Content in Lamb Meat Is Differentially Altered upon Boiling, Grilling, or Frying as Assessed by Four Distinct Analytical Methods. *Sci World J*, 8, 374030.

Pretorius, B., Schönfeldt, H.C. & Hall, N. (2016). Total and haem iron content lean meat cuts and the contribution to the diet. *Food Chem*, 193, 97-101.

Purchas, R.W., Simcock, D.C., Knight, T.W. & Wilkinson, B.H.P. (2003). Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *Int J Food Sci Technol*, 38, 827-837.

Urdampilleta, A., Martínez, J.M. & González, P. (2010). Intervención dietético-nutricional en la prevención de la deficiencia de hierro. *Nutr. clín. diet. hosp.*, 30(3), 27-41.