

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CON MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN  
Y ULTRAFILTRACIÓN PARA LA CLARIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE  
SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA**

**JULIETH STEPHANIE ACOSTA CAMACHO  
SILVIA NORIETH RIOS MORALES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2013**

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CON MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN  
Y ULTRAFILTRACIÓN PARA LA CLARIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE  
SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA**

**JULIETH STEPHANIE ACOSTA CAMACHO  
SILVIA NORIETH RIOS MORALES**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de  
Ingeniero Químico**

**Director:  
Prof. CARLOS JESÚS MUVDI NOVA  
Ingeniero Químico, MSc., Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2013**

*A mi madre Luz Mireya Camacho Moros, por ser la guía y el ejemplo que ha regido mi vida, por brindarme la mejor educación e inculcarme los valores que me han hecho mejor persona. Siempre me he sentido orgullosa de la madre que tengo y me esfuerzo para que ella también lo esté de mí. Te amo y gracias a ti, ya soy Ingeniera!*

*A mi hermano Andrés Leonardo Acosta Camacho y mi tía Doris Camacho Moros, por su cariño, compañía, palabras de aliento y apoyo constante en el transcurso de mi vida.*

*A Oscar Mauricio Tobo Niño, porque desde que llegaste has tornado mis días de otro color con tu amor, compañía, apoyo, paciencia y cariño... en fin por ser parte importante de mi vida, Gracias!*

*A la Familia Forero Gutiérrez por su confianza, apoyo constante y por ser parte significativa de mi vida. Especialmente a Diana Forero Gutiérrez, por su amistad incondicional a través de tantos años y por creer en mí hasta el último momento.*

*Julieth Stephanie Acosta Camacho*

*Quien a DIOS tiene, nada le falta...*

*sólo DIOS basta...*

*Santa Teresa de Jesús*

*A mis papás, Marina e Israel, por su paciencia, tiempo, dedicación, todo lo que soy es gracias a ellos, esto es por ellos y para ellos, son los mejores maestros que se puede tener...*

*A mi hermana, Lorena, por todos los buenos y malos momentos vividos durante estos largos años...*

*A mis amigos, por los recuerdos imborrables y por todas las enseñanzas que han dejado durante mi vida...*

*A Julieth, por los momentos vividos durante este recorrido... su apoyo, comprensión y alegría hicieron que esta experiencia sea inolvidable...*

*Silvia Norieth Rios Morales*

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras de este trabajo expresan su agradecimiento a:

A la **Universidad Industrial de Santander** por su formación académica y servicios prestados a través de la carrera.

A **VIJAGUAL S.A.** por permitir la realización de este proyecto mediante el suministro de la materia prima.

A la **Escuela de Ingeniería Química** por acogernos y brindarnos el conocimiento a lo largo de nuestra vida universitaria.

Al **Doctor Carlos Jesús Muvdi Nova**, por su apoyo, compromiso y dedicación a lo largo de la elaboración de este trabajo.

Al **Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, CICTA por permitirnos usar sus equipos e instalaciones para el desarrollo del proyecto. Y especialmente al Ing. Luis Carlos Rodríguez por su ayuda y apoyo constante.

A **Nuestros Padres** por su paciencia, colaboración y palabras de apoyo en el transcurso de nuestra vida universitaria.

A **Oscar Mauricio Tobo Niño**, por su constante colaboración y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A **Nuestros Amigos**, por acompañarnos en nuestra vida universitaria.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	16
<b>2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA</b>	21
2.1 PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	21
2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS	23
<b>3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	26
3.1 EFECTO DEL DIÁMETRO DE PORO SOBRE LOS FILTRADOS DE SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA.	26
3.2 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL PERMEADO EN EL TIEMPO UTILIZANDO SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA.	34
<b>CONCLUSIONES</b>	41
<b>ESTUDIOS A FUTURO</b>	43
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	44

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Tipos de Separación con membranas con base en el diámetro de poro.	19
<b>Tabla 2.</b> Composición de la sangre de bovino cruda y sobrenadante de centrifugado de sangre de bovino (plasma bovino) a 7600 x g por 20 min a 4°C.	27
<b>Tabla 3.</b> Composición de los prefiltrados con membrana de 0,2 µm de sangre de bovino cruda e hidrolizada.	34
<b>Tabla 4.</b> Composición de los permeados secos obtenidos con membranas de 300 kDa a 50°C para la fase uno (sangre de bovino cruda) y la fase dos (hidrolizados de sangre de bovino).	40

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema de la separación con membranas.	19
<b>Figura 2.</b> Planteamiento metodológico.	21
<b>Figura 3.</b> Esquema piloto de ultrafiltración y microfiltración con membranas.	24
<b>Figura 4.</b> Sangre de bovino cruda y plasma de sangre de bovino. (a) Muestra inicial de sangre de bovino cruda. (b) Muestra de sobrenadante de sangre de bovino centrifugada a 7600 x g por 20 min a 4°C.	26
<b>Figura 5.</b> Evolución del color de permeados de membranas de diferentes diámetros de poros obtenidos a 20°C, $\Delta P_{TM}$ 1 bar y velocidad de alimentación de 13 m/s en un tiempo de 2 h. (a) Permeado con membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ . (b) Permeado con membrana de 0,2 $\mu\text{m}$ . (c) Permeado con membrana de 300 kDa. (d) Permeado con membrana de 150 kDa.	28
<b>Figura 6.</b> Análisis realizados a permeados de membranas de 0,45 $\mu\text{m}$ , 0,2 $\mu\text{m}$ , 300 kDa y 150 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino cruda a 20°C , 1 bar de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 2 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.	29
<b>Figura 7.</b> Hidrolizado de sangre de bovino obtenido a 53°C, pH de 8,34 y una concentración de enzima (Alcalasa 2,4 L) de 0,76 %p/p antes y después de la clarificación con membrana de 0,2 $\mu\text{m}$ , a 50°C y 1,5 bares de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s (a) Hidrolizado de sangre. (b)Hidrolizado prefiltrado.	31
<b>Figura 8.</b> Evolución del color de permeados de prefiltrado de hidrolizados de sangre con membranas de diferentes diámetros de poros obtenidos a 50°C, $\Delta P_{TM}$ 1 bar y velocidad de alimentación de 13 m/s en un tiempo de 2 h. (a) Permeado con membrana de 300 kDa. (b) Permeado con membrana de 50 kDa. (c) Permeado con membrana de 10 kDa. (d) Permeado con membrana de 5 kDa.	32
<b>Figura 9.</b> Composición de los permeados con membranas de 300 kDa, 50 kDa, 10 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar prefiltrados de hidrolizados de sangre a 50°C, 1 bar de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 2 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteína. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.	33

<b>Figura 10.</b> Evolución del color en el tiempo en permeados de 300 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino prefiltrada a 12°C, 1,5 bar de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Permeados membrana de 300 kDa. (b) Permeados membrana de 5 kDa.	35
<b>Figura 11.</b> Composición de los permeados con membrana de 300 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino cruda prefiltrada a 12°C, 1,5 bares de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.	36
<b>Figura 12.</b> Evolución del color en el tiempo en permeados de 300 kDa obtenidos de la filtración de prefiltrados de hidrolizados de sangre de bovino a 50 °C, 1 bar de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h.	36
<b>Figura 13.</b> Composición de los permeados de membrana de 300 kDa obtenidos al filtrar prefiltrados de hidrolizado de sangre de bovino a 50°C, 1 bar de $\Delta P_{TM}$ y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades	38
<b>Figura 14.</b> Concentración de hierro en las muestras analizadas en la fase 1 y 2. (a) Fase 1 - Sangre de bovino cruda. (b) Fase 2 - Hidrolizados de sangre.	39
<b>Figura 15.</b> Apariencia de los productos secos obtenidos luego del secado a 50°C. (a) Sangre de bovino cruda seca (b) Producto seco de la primera fase. (c) Producto seco de la segunda fase.	40

## RESUMEN

**TÍTULO:** APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS CON MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN Y ULTRAFILTRACIÓN PARA LA CLARIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE SANGRE DE BOVINO E HIDROLIZADA\*

**AUTORES:** Julieth Stephanie Acosta Camacho, Silvia Norieth Rios Morales\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Sangre de bovino, hidrólisis enzimática, filtración con membranas, clarificación, permeabilidad.

En Colombia se sacrifican anualmente cerca de cuatro millones cabezas de ganado vacuno, que representan aproximadamente 45 mil toneladas de sangre. El 53% de dicha cantidad, comúnmente se vierte en cauces hídricos generando contaminación ambiental y desperdiciando el potencial nutricional presente en dicho subproducto. Se estudió las técnicas con membranas aplicadas a la sangre de bovino cruda e hidrolizada con el fin de ampliar los conocimientos del efecto del diámetro de poro y la permeabilidad en el tiempo en las características fisicoquímicas de los permeados.

Se realizaron filtraciones con sangre cruda e hidrolizada con membranas de 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 300 kDa, 150 kDa, 50 kDa, 10 kDa y 5 kDa de diámetro de poro por un tiempo de 2 h. Posteriormente se filtró durante 14 h con membranas de 300 kDa y 5 kDa para la sangre cruda y 300 kDa para el hidrolizado de sangre. Finalmente, se secaron los permeados recolectados (50°C) en la etapa anterior para analizarlos fisicoquímicamente.

Para la sangre cruda, se determinó que el diámetro de poro es una variable que condiciona las características fisicoquímicas de los permeados y permeabilidad de la membrana. La filtración con membranas de 300 kDa y 5 kDa presentó un porcentaje de retención de materia seca de hasta 80% durante las 14 h de filtración.

Para el hidrolizado de sangre, el diámetro de poro no influyó en las características fisicoquímicas de los permeados. En la filtración con membrana de 300 kDa durante 14 h, no se presentó diferencia de las características fisicoquímicas entre los retenidos y permeados obtenidos. Finalmente, los permeados secos de sangre cruda e hidrolizada presentaron alto porcentaje de cenizas (87% y 24% respectivamente) y de proteínas (68% para el permeado de sangre hidrolizada) que permiten considerarlos para estudios futuros de valorización como aditivo para la industria alimenticia.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova, Ingeniero Químico, MSc., Ph.D.

## ABSTRACT

**TITLE:** APPLICATION OF MICROFILTRATION AND ULTRAFILTRATION MEMBRANE TECHNIQUE TO CLARIFICATION AND SEPARATION OF BOVINE BLOOD AND HYDROLYZED\*

**AUTHORS:** Julieth Stephanie Acosta Camacho, Silvia Norieth Rios Morales\*\*

**KEYWORDS:** Bovine blood, enzymatic hydrolysis, membrane filtration, clarification, permeability.

Annually in Colombia are being slaughtered about four million of cattle, representing approximately 45 thousand tons of blood. Commonly, the 53% of this amount is poured into water resources causing environmental contamination and wasting the nutritional potential present in this by-product. This research work studied membrane techniques applied to crude bovine blood and hydrolyzed, in order to amplify the knowledge of effect of pore diameter and the permeability in time on the physicochemical characteristics of permeates.

Bovine blood and hydrolyzed filtrations were made with membranes of 0,45  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$ , 300 kDa, 150 kDa, 50 kDa, 10 kDa and 5 kDa pore diameter for 2 h. Then filtered for 14 h with membranes of 300 kDa and 5 kDa for crude blood and 300 kDa to the hydrolysates. Finally, the permeate collected in the preceding stage was dried (50°C) to analyze physicochemically.

To crude blood was concluded that the pore diameter is a variable that determines the physicochemical properties of the permeate and the membrane permeability. Filtration with membrane of 300 kDa and 5 kDa showed a retention percentage of dry matter up to 80% during 14 h.

To blood hydrolysates, the pore diameter do not have influence in the physicochemical characteristics of the permeates. In filtration with membrane of 300 kDa during 14 h, was not seen difference on the physicochemical characteristics between retained and permeated obtained. Finally, dried crude blood and hydrolyzed, had highest percentage of ash (87% and 24% respectively) and protein (68% for blood hydrolyzed), allowing for future studies as additive for food industry.

---

\* Undergraduate Project.

\*\* Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering. Food Science and Technology Research Center. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova, Chemical Engineer, MSc., Ph.D.

## INTRODUCCIÓN

Según estadísticas del DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística) en Colombia se sacrifican anualmente cerca de cuatro millones cabezas de ganado vacuno; utilizados básicamente para el consumo interno del país y como producto de exportación. Dichas cabezas de ganado representan aproximadamente 45 mil toneladas de sangre, que comúnmente son vertidas a los cauces de los ríos desperdiciando todo su potencial nutricional (proteínico y mineral). Además de generar una contaminación drástica de dichas fuentes hídricas por el aumento de la demanda biológica de oxígeno (DBO), y con ello la disminución del oxígeno disponible y necesario para la supervivencia de los ecosistemas acuáticos (Silva, 2007).

Según el Decreto 1036 de 1991 expedido por el Ministerio de Salud de la República de Colombia, existen legalmente cinco tipos de casas de sacrificio animal (Tipo I, II, III, IV y mínimos). Éstas están clasificadas según su capacidad de sacrificio y disponibilidades técnicas y de dotación. De acuerdo a este decreto, sólo las casas de sacrificio tipo I tienen como obligación tratar dicho subproducto.

Entre los procesos utilizados para tratar la sangre de bovino el más empleado en Colombia es el secado a altas temperaturas para la obtención de harina de sangre. Esta harina es usada para la elaboración de concentrados alimenticios para animales, ya que su fuerte sabor y color no le permiten su uso en la formulación de alimentos para humanos (Silva y Chocontá, 2007) (Bizzotto *et al.*, 2005). El inconveniente de este proceso es que afecta significativamente las propiedades funcionales de las proteínas y la disponibilidad de aminoácidos presentes en dicho subproducto (FAO, 1997).

Las casas de sacrificio restantes (Tipo II, III, IV y mínimos), que representan aproximadamente el 96% del total nacional (Procuraduría General de la Nación,

2007), debido a limitaciones técnicas o económicas, no realizan un correcto tratamiento de la sangre resultante de su actividad productiva. Como consecuencia de esto, incurren en problemas con entidades como el INVIMA, generando multas o cierres en dichos establecimientos por no asegurar la calidad sanitaria o ambiental de sus procesos (Chaux *et al.*, 2009).

La valorización de la sangre de bovino tiene grandes ventajas que podrían incidir en diferentes ámbitos de la sociedad actual. Desde el punto de vista medioambiental, disminuyendo la carga orgánica de las fuentes hídricas involucradas; social, por el aprovechamiento de las proteínas y demás componentes presentes en la sangre bovina, que pueden ser implementados en la industria alimenticia; económico, debido a que el proceso consiste en darle valor agregado a un subproducto que es normalmente desperdiciado; y tecnológico, pues con la implementación de estos procesos, se abre la oportunidad de explorar nuevas alternativas de separación de los componentes de la sangre para su posterior utilización.

La sangre de bovino está compuesta en promedio por 80,9% de agua, 17,3% de proteínas, 0,23% de lípidos, 0,007% de carbohidratos y un 0,62% de minerales (Duarte *et al.*, 1999). Ésta puede ser separada en dos fases, la fase sólida donde se encuentran los glóbulos blancos, rojos y plaquetas, y la fase líquida que es el plasma el cual está compuesto por un 90% de agua, 7,9% de proteínas (4,2% inmunoglobulinas, 3,3% albúminas, 0,4% fibrinógeno) y por 2,1% de lípidos, glucosa, vitaminas, entre otras (Duarte *et al.*, 1999). Adicionalmente, la sangre de bovino es un subproducto que contiene todos los aminoácidos esenciales para el ser humano (Zamora *et al.*, 2012).

Además de los nutrientes que componen la sangre de bovino, las proteínas de plasma bovino presentan propiedades funcionales atractivas para la industria alimenticia. Tales como capacidad de gelación, adhesión, emulsificación y

espesamiento de los productos, similar a las propiedades de la leche o del huevo (Benítez *et al.*, 1999) (Panyam y Kilara, 1996). Adicionalmente, se encontró que los péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis con Alcalasa 2,4 L de plasma de bovino poseen una actividad antioxidante semejante a algunos antioxidantes comerciales (Gómez *et al.*, 2013).

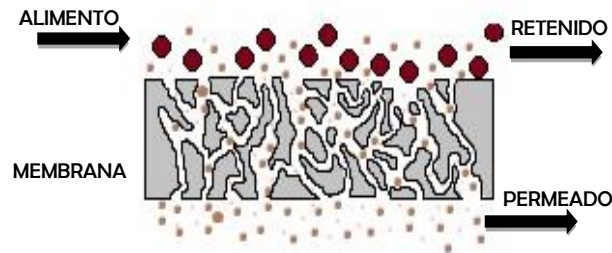
En diversos países se están utilizando las proteínas de la sangre de bovino (e.g. la albúmina) en la industria alimenticia para humanos como emulsificantes, colorantes y texturizantes de productos cárnicos, estabilizadores de quesos (Isaza *et al.*, 2010). Y no sólo proteínas, también han aprovechado el hierro contenido en este subproducto para la fabricación de galletas (Asenjo y Amar, 1985), bebidas instantáneas (Gutiérrez y González, 1997) y chocolates (Méndez, 2011).

Entre los procesos usados para el tratamiento de sangre de bovino, que conservan la proteína, se encuentran la evaporación al vacío, la liofilización, la filtración en gel y la separación con membranas (Kokkora *et al.*, 2012).

En este trabajo se utilizaron técnicas con membranas de microfiltración y ultrafiltración para la separación de soluciones provenientes de sangre de bovino. Se decidió aplicar dichas técnicas porque permiten trabajar con sustancias sensibles a la temperatura, a bajos requerimientos de energía, son amigables con el medio ambiente y de fácil limpieza y mantenimiento (Monroy, 2013) (Kokkora *et al.*, 2012).

Estas dos técnicas son conocidas como técnicas baromembranarias debido a que el paso de una sustancia a través de la membrana porosa se debe a un gradiente de presión que induce la separación de los componentes de la sustancia tomando como base el tamaño o la carga molecular. En la Figura 1, se presenta un esquema de la separación con membranas, donde la encargada de dicha separación es una barrera selectiva (membrana) que se encarga de retener ciertos

componentes haciendo que en una de las fases, la concentración de dicho componente sea mayor (retenido) que en la otra (permeado).



**Figura 1. Esquema de la separación con membranas.** Fuente: Autor

Comercialmente las membranas se encuentran en diferentes configuraciones como: membranas planas, en espiral, fibra hueca o tubular. Igualmente, los procesos con membranas se pueden clasificar con base en el diámetro de poro de la membrana y la presión transmembranaria  $\Delta P_{TM}$ , necesaria para que ocurra la separación (Benito *et al.*, 2004). La clasificación se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1. Tipos de Separación con membranas con base en el diámetro de poro.** Fuente: Cui y Muralidhara, 2010.

Tipo de Separación con Membranas	Diámetro de Poro [kDa]	Intervalo $\Delta P_{TM}$ [bar]
Nanofiltración (NF)	0,1 – 0,5	10 – 30
Ultrafiltración (UF)	0,5 – 100	1 – 10
Microfiltración (MF)	>100	1 – 10

En el proceso de la separación con membranas ocurre un fenómeno conocido como colmatación, que consiste en el taponamiento de los poros de la membrana lo que conlleva a una disminución del flujo de permeado. Por dicha razón es importante controlar variables como la presión transmembranaria, la temperatura y la velocidad de flujo de la alimentación (Benito *et al.*, 2004).

A través de la separación con membranas se ha logrado separar la fracción celular del plasma bovino por medio de microfiltración y analizar la productividad del proceso a través de las permeabilidades (Kokkora *et al.*, 2012). Adicionalmente, se

ha analizado las propiedades funcionales (solubilidad, capacidad emulsificante y espumante) del permeado obtenido por ultrafiltración de plasma de bovino (Hoyo *et al.*, 2007). De la misma manera, se ha utilizado la ultrafiltración como método para concentrar y desmineralizar el plasma de bovino para posterior uso como ingrediente alimenticio (Rodríguez *et al.*, 2009).

Este trabajo planteó también el uso de la hidrólisis enzimática como estrategia para la valorización de la sangre de bovino. El proceso de hidrólisis de proteínas permite la obtención de péptidos, polipéptidos y aminoácidos provenientes de las proteínas bovinas a través de proteasas (alcalasa y neutrasa principalmente) (Park y Hyun, 2002). Estos hidrolizados son usados en la industria alimenticia por sus propiedades de retención de agua, emulsificantes, de viscosidad y de gelificación. Así mismo, es un proceso beneficioso por: la selectividad (tipo de enzimas), condiciones suaves de operación y por la conservación del valor nutritivo de las proteínas sanguíneas (no hay degradación de los componentes separados). Por otra parte, estudios con hidrolizados de plasma de bovino encontraron que la albúmina bovina es una fuente proteínica prometedora en los tratamientos para la quimioprotección por lo tanto al ser usada en la industria alimenticia potenciaría las actividades inmunológicas en el organismo (Park y Hyun, 2002).

Con lo anterior, se observa que no existen estudios sobre la colmatación en el tiempo, ni de la influencia del diámetro de poro en las características del permeado durante la filtración de sangre de bovino o de sus hidrolizados. Por dichas razones, se plantea el estudio de las técnicas de microfiltración y ultrafiltración aplicadas a este subproducto, para resolver las dudas existentes en dichas temáticas y entregar resultados que puedan servir de base para esquemas de valorización posteriores.

## 2. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

### 2.1 PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

En la Figura 2 se presenta el planteamiento metodológico propuesto para la realización del trabajo. En este se definieron dos fases, la primera que consistió en el estudio de la microfiltración en el fraccionamiento de sangre de bovino cruda, y la segunda, en donde se trabajó en la ultrafiltración de hidrolizados de sangre de bovino.

La sangre de bovino fue suministrada por el FRIGORÍFICO VIJAGUAL S.A., a la cual se le adicionó citrato de sodio al 1% (v/v) como anticoagulante para mantener las propiedades físicas de ésta. Las condiciones de recolecta y estabilización de la sangre se establecieron a través de pruebas preliminares.

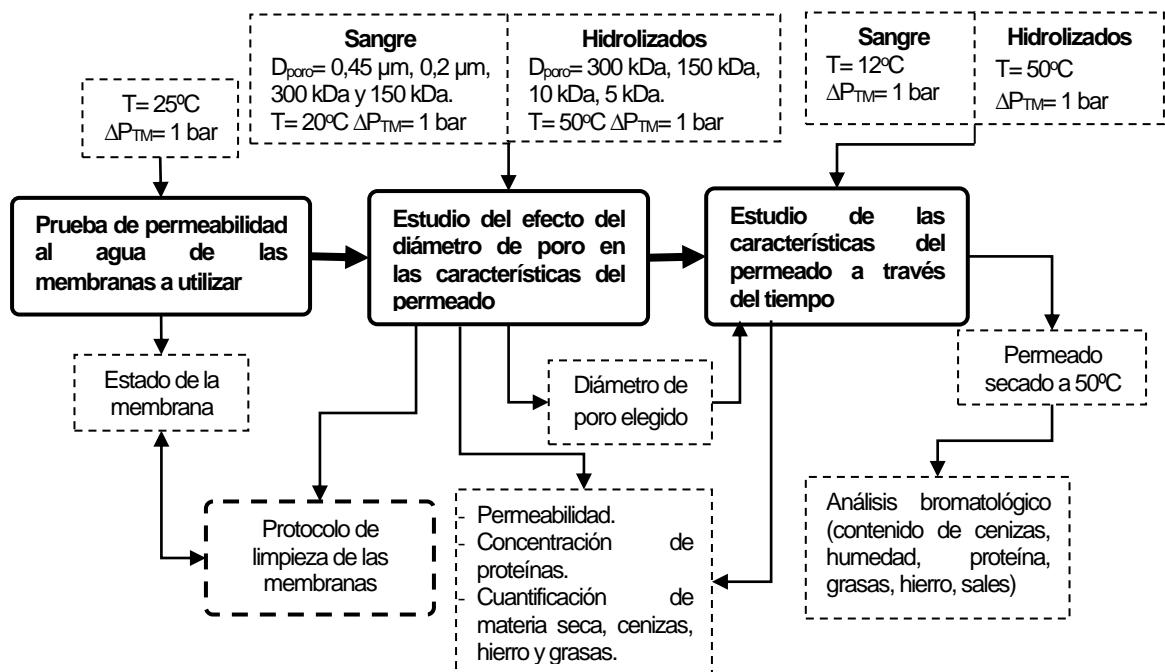


Figura 2. Planteamiento metodológico. Fuente: Autor

### 2.1.1 Prueba de permeabilidad al agua de las membranas.

La prueba de permeabilidad al agua se aplicó a las membranas a utilizar en las dos fases del trabajo. Esto con el fin de determinar el estado inicial de las mismas y tener un parámetro de referencia que permita asegurar la limpieza de éstas; el cual está directamente relacionado con el protocolo de limpieza planteado. La permeabilidad al agua de las membranas se determinó a los 30 min de filtración a una temperatura de 25°C y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ .

### 2.1.2 Estudio del efecto del diámetro de poro sobre filtrados de sangre de bovino cruda e hidrolizada

Se tomaron muestras de permeado cada 30 min y éstas se caracterizaron para determinar concentración de proteínas, cenizas y materia seca.

Para la sangre cruda la filtración duró 2 h a 20°C (limitaciones baño termostático) y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ . Los diámetro de poro evaluados fueron 0,45 $\mu$ m, 0,2 $\mu$ m, 300kDa y 150kDa (retención compuestos de fase celular (Kokkora *et al.*, 2012)).

Para los hidrolizados de sangre, el estudio se llevó a cabo por 2h, a una temperatura de 50°C (Monroy, 2013) y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ . Los diámetro de poro evaluados para esta fase fueron 300 kDa, 50 kDa, 10 kDa y 5 kDa (tamaño poro ofrecido por el distribuidor de membranas para ultrafiltración). Para esta fase, fue necesario hacer una prefiltración del hidrolizado de sangre de bovino previa (50°C (Monroy, 2013) y 2 bar de  $\Delta P_{TM}$ ) hasta obtener un volumen de permeado suficiente para la continuación de los estudios de esta etapa.

### 2.1.3 Estudio de la colmatación y las características del permeado en el tiempo

Las dos fases operaron durante 14 h en las cuales se tomaron muestras cada 2 h para determinar la cantidad de materia seca, cenizas, proteínas y se midió la permeabilidad durante el proceso. Los diámetros de poro utilizados, fueron

escogidos con base en los resultados obtenidos en la etapa anterior. Durante esta etapa se recolectó un litro de permeado para su posterior caracterización (mismos parámetros mencionados anteriormente y adicionalmente contenido de hierro y sodio) y posteriormente dichos permeados se secaron a 50 °C para obtener un producto seco, que se analizó fisicoquímicamente.

Para los hidrolizados de sangre, las condiciones de filtración fueron de 50°C y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ .

Para la sangre cruda, el proceso operó a una temperatura de 12°C y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ . Para llevar a cabo esta fase fue necesario hacer una prefiltración de la sangre de bovino. Las condiciones de operación de la prefiltración fueron las mismas que la etapa anterior (20°C y 1 bar de  $\Delta P_{TM}$ ), excepto por el tiempo de filtración, que fue definido por 1 h (por cada cochada) debido a la caída de permeabilidad presente en el proceso.

## **2.2 MÉTODOS EXPERIMENTALES Y DE ANÁLISIS**

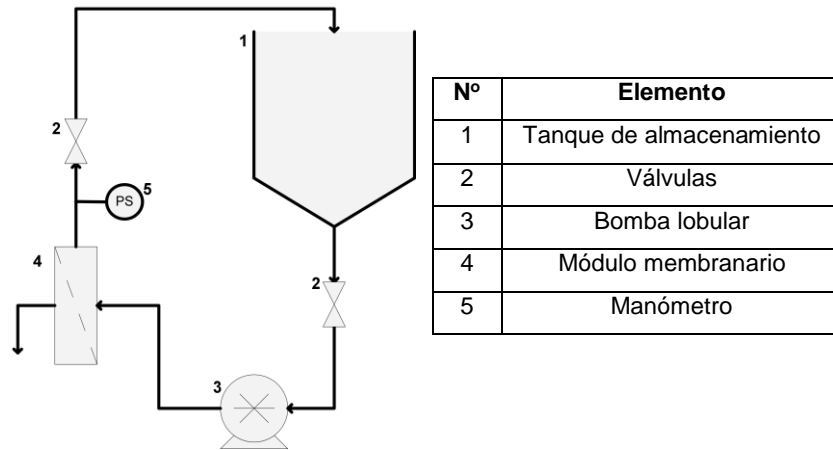
### **2.2.1 Materiales e insumos**

Los materiales, insumos y reactivos utilizados durante la experimentación fueron:

- Sangre de Bovino, suministrada por el FRIGORÍFICO VIJAGUAL S.A.
- Membranas cerámicas monocanal de  $\alpha$ -lúmina, TAMI®
- Enzimas Alcalasa 2,4 L provista por NOVOSYMES®.
- pH-metro marca HANNA® HI 991001.
- Hipoclorito de sodio al 15%, hidróxido de sodio en escamas y pellets suministrado por SUQUIN Ltda, HCl al 37% marca MERCK®, azul de coomasie G-250, etanol al 99.9%, albúmina de suero bovino marca MERCK®, ácido orto fosfórico al 85%, suministrado por YEQUIM Ltda, n-hexano marca MERCK® provisto por ARTILAB Ltda y Citrato de sodio grado alimenticio, suministrado por SUQUIN Ltda.

### 2.2.2 Piloto de ultrafiltración y microfiltración membranaria.

Para el desarrollo del trabajo se utilizó el piloto que se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Esquema piloto de ultrafiltración y microfiltración con membranas.** Fuente: Autor

Los componentes del piloto de filtración con membranas son:

- Tanque de almacenamiento de 10 L enchaquetado en acero inoxidable.
- Bomba de alimentación en acero inoxidable, lobular, tipo SRU (Alfa Laval), acoplada con un motor SewEurodrive® de 0,5 HP y 439 r.p.m a 60 Hz.
- Módulo membranario en acero inoxidable.
- Válvulas, ubicadas a la salida del tanque de alimentación (válvula de mariposa) y a la salida del retenido (válvula globo), donde la última permite ajustar la presión transmembranaria del sistema.
- Manómetro, indica la presión transmembranaria

### 2.2.3 Hidrólisis de sangre de bovino

El proceso de la hidrólisis enzimática de la sangre de bovino se realizó a una temperatura de 53°C, pH de 8,34 y una concentración de enzima de 0,76% p/p por un tiempo de 25 min que aseguraban un grado de hidrólisis de 10% (verificada experimentalmente) (Monroy, 2013). Para controlar el pH se utilizó NaOH 2N. La desactivación de la enzima se realizó a pH 4 utilizando HCl 4N durante 30 min (Ficha técnica Alcalase® Grado alimenticio, Novozymes).

#### 2.2.4 Protocolo de limpieza

Al final de cada filtración, se estudió el protocolo de limpieza de las membranas (depende del tipo de membrana y aplicación). Éste se fijó utilizando una solución de NaOH 0,5 N y 1% de NaClO, a 1 bar de  $\Delta P_{TM}$  y 60 °C y 1 h de filtración. Posteriormente se hizo un lavado del sistema con agua hasta neutralidad y finalmente se verificó la permeabilidad al agua de éstas.

#### 2.2.5 Métodos de cuantificación.

Para el análisis de las muestras obtenidas en el desarrollo del trabajo se utilizaron los siguientes métodos experimentales:

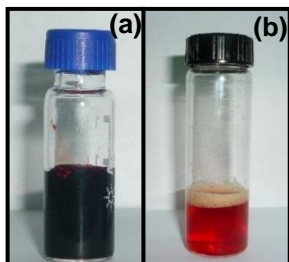
- Permeabilidad: Se determinó volumétricamente, al relacionar los caudales de permeado en un tiempo determinado. Fue determinada para todas las filtraciones y después de cada proceso de lavado, permitiendo caracterizar la membrana en términos de productividad y limpieza respectivamente (Benavente *et al.*, 2000).
- Cuantificación de proteína: Para determinar la cantidad de proteína en los permeados y retenidos de sangre de bovino, se empleó el método colorimétrico de Bradford. Se determinó a partir del reactivo Bradford (Walker, 2002) y un espectrofotómetro Genesys 20 ThermoSpectronic. Para los hidrolizados, la cuantificación se determinó al restar al 100% el contenido de agua y cenizas (contenido de carbohidratos y lípidos despreciable para la sangre de bovino cruda (Duarte *et al.*, 1999), verificado experimentalmente).
- Porcentaje Materia seca: Se determinó mediante diferencia de peso (Norma AOAC 950.46 B. Ed. 18: 2005).
- Porcentaje de Cenizas: Este valor se relaciona con la cantidad de minerales en la muestra (Pearson, 1993). Se utilizó el método establecido por la Norma AOAC 920.153 Ed 18: 2005.
- Porcentaje de lípidos: Se trabajó con la norma NTC 1662: 2008, basada en la técnica de extracción Soxhlet.

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La primera etapa que consistió en la determinación de las permeabilidades de las membranas al agua, fue una etapa esencial en el transcurso de la realización del trabajo de grado, ya que con ésta se estableció el protocolo de limpieza adecuado para el sistema. En este trabajo no se presentan los resultados obtenidos en esta etapa, ya que no son influyentes en el estudio planteado para éste.

#### 3.1 EFECTO DEL DIÁMETRO DE PORO SOBRE LOS FILTRADOS DE SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA.

Al iniciar este estudio, se realizó una comparación del análisis fisicoquímico de la sangre de bovino cruda y del sobrenadante centrifugado (plasma). En la Figura 4, se puede comparar visualmente una muestra de sangre de bovino cruda frente una muestra de plasma de sangre de bovino obtenido por centrifugación a 7600 x g por 20 min a 4°C (Park y Hyun, 2002). Es de destacar que la sangre de bovino cruda presenta una tonalidad notablemente más oscura que el plasma bovino.



**Figura 4. Sangre de bovino cruda y plasma de sangre de bovino. (a) Muestra inicial de sangre de bovino cruda. (b) Muestra de sobrenadante de sangre de bovino centrifugada a 7600 x g por 20 min a 4°C.**

Las composiciones de la sangre de bovino cruda y del plasma de bovino se encuentran en la Tabla 2. Comparando estos valores con los obtenidos por Alencar (1983), se observa una similitud entre los porcentajes de agua (80,9%), proteína (17,3%) y lípidos (0,23%). De acuerdo al porcentaje de carbohidratos

reportados por éste (aproximadamente 0,07%), se decidió no determinar dicho valor para este trabajo ya que es despreciable.

**Tabla 2. Composición de la sangre de bovino cruda y sobrenadante de centrifugado de sangre de bovino (plasma bovino) a 7600 x g por 20 min a 4°C.**

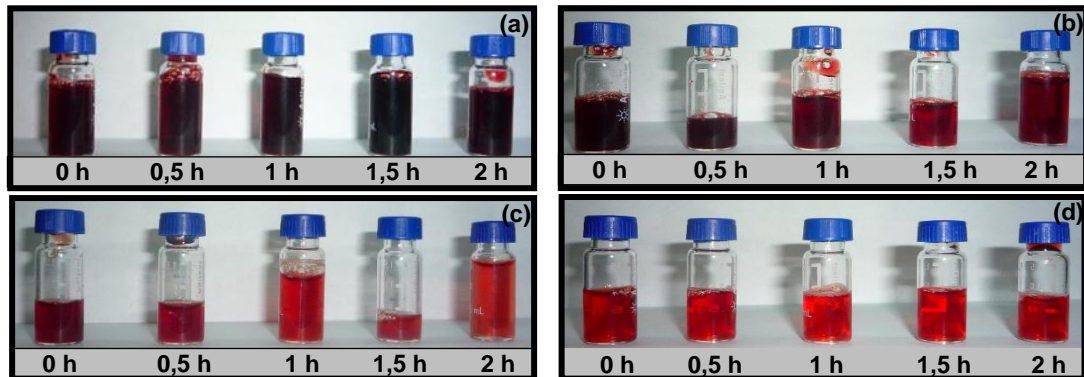
<b>% Componente</b>	<b>Sangre de bovino</b>	<b>Plasma de bovino</b>
<b>Agua</b>	78,33 ± 0,32	89,7 ± 0,08
<b>Proteínas</b>	18,60 ± 0,39	6,49 ± 0,05
<b>Lípidos</b>	0,52 ± 0,03	0,80 ± 0,04
<b>Minerales</b>	3,01 ± 0,05	1,71 ± 0,16

Respecto a la composición del plasma de bovino obtenido por centrifugación, los resultados se asemejan a los reportados por Hoyo *et al.* (2008). Según ellos, el plasma de bovino presenta en su composición un 91% de agua, 7% de proteína y un 1% de sales y compuestos de bajo peso molecular (esencialmente correspondería a las cenizas). Ellos no reportan contenido de lípidos pero considerando los porcentajes anteriormente mencionados correspondería a un 1% en base húmeda.

La diferencia de la cantidad de minerales (mayor contenido) encontrada en la sangre utilizada en el presente trabajo se atribuye al citrato de sodio adicionado como estrategia para evitar la coagulación de la sangre. Igualmente hay que considerar posibles diferencias en la composición de la sangre debido a factores como la raza, la edad, la alimentación y el clima donde habita el animal (Rocha, 2006).

Posteriormente, se realizó el estudio bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.2. La Figura 5 muestra la evolución del color en los permeados obtenidos durante la filtración de sangre de bovino cruda para cada diámetro de poro de la membrana. En ésta, se puede apreciar que con las membranas de 300 kDa y 150

kDa se obtiene una clarificación similar a la obtenida por centrifugación para el plasma de bovino (ver Figura 4 (b)).



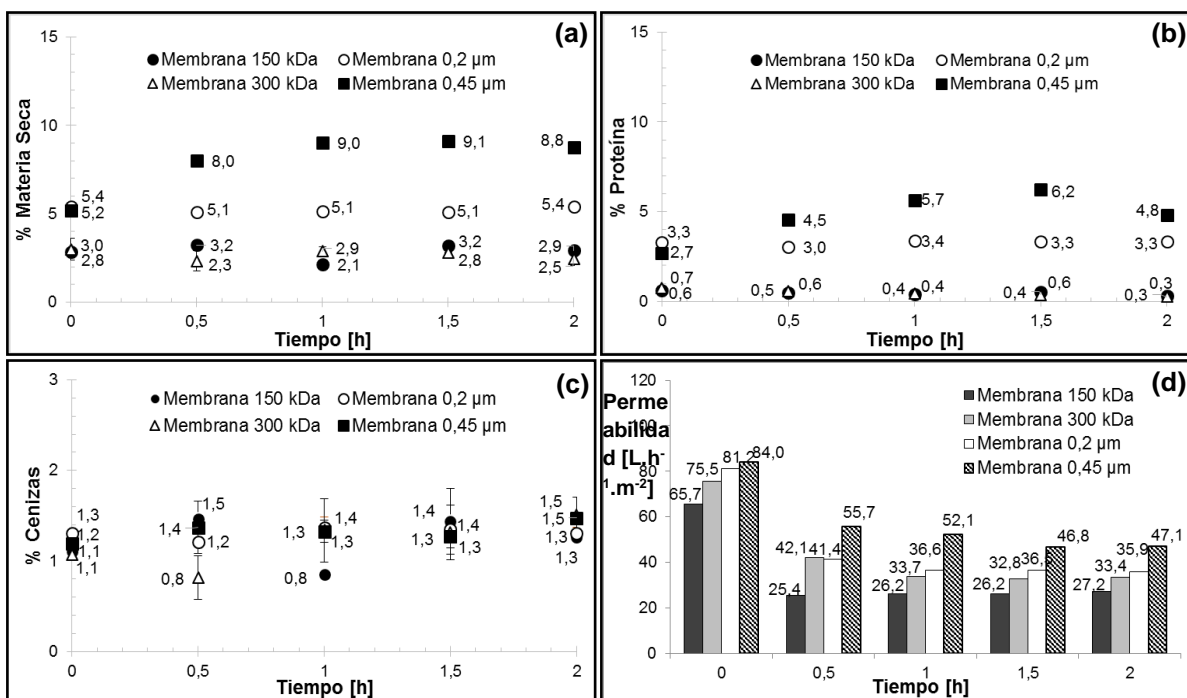
**Figura 5. Evolución del color de permeados de membranas de diferentes diámetros de poros obtenidos a 20°C,  $\Delta P_{TM}$  1 bar y velocidad de alimentación de 13 m/s en un tiempo de 2 h. (a) Permeado con membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . (b) Permeado con membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . (c) Permeado con membrana de 300 kDa. (d) Permeado con membrana de 150 kDa.**

Los permeados obtenidos con membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ , 300 kDa y 150 kDa presentaron un color más claro a través del tiempo. Lo que significa que los diámetros de poro estudiados en esta etapa tienen una influencia significativa en las propiedades físicas de los permeados. La clarificación obtenida puede atribuirse a la disminución en el contenido del grupo hemo en cada uno de los permeados. Los permeados se mostraron más estables en el tiempo que la sangre cruda alimentada, debido a que con la filtración se redujo la fracción celular presente en ésta, que favorece la descomposición de la sangre.

Los permeados de 0,2  $\mu\text{m}$  aún presentan una coloración roja a diferencia de lo reportado por Kokkora *et al.* (2012), quienes obtuvieron un permeado sin coloración para membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ . Este fenómeno se atribuye a que ellos emplearon una bomba peristáltica, que a diferencia de la bomba lobular utilizada en este estudio, el fluido procesado no estaba en contacto con los elementos móviles de la bomba, evitando la lisis celular. En este estudio en particular utilizó equipo (bomba lobular) que se pudiera adecuar a la industria, contrario a lo visto en estudios anteriores.

La Figura 6 muestra los porcentajes de materia seca, proteína, cenizas y permeabilidades de los permeados resultantes del estudio del diámetro de poro para sangre cruda. En ella se observa que, al disminuir el tamaño de poro de las membranas, disminuye el porcentaje de materia seca, reduciendo principalmente el contenido de proteínas en los permeados (Figura 6(a) y 6(b)).

Adicionalmente, no existe una diferencia significativa entre la cantidad de materia seca y proteínas de los permeados de las membranas de 300 kDa y 150 kDa. Este fenómeno se atribuye a que las dos membranas están reteniendo moléculas de similar tamaño molecular, lo mismo se observa en la clarificación lograda en los permeados. En relación a esto, es importante resaltar que en una membrana no hay un único diámetro de poro, éste es el resultado de una distribución (Gaussiana); en donde el tamaño de poro reportado es el que asegura una retención del 90-95% de una molécula o partícula de referencia con ese tamaño (generalmente esférica) (Cui y Muralidhara, 2010).



**Figura 6. Análisis realizados a permeados de membranas de 0,45 μm, 0,2 μm, 300 kDa y 150 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino cruda a 20°C , 1 bar de ΔP<sub>TM</sub> y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 2 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.**

En cuanto al contenido de cenizas, este porcentaje fue similar en todas las membranas estudiadas, lo que permite concluir que el diámetro de poro no es una variable significativa para este parámetro. Respecto a las permeabilidades, se observa que éstas disminuyen de acuerdo con el tamaño de poro evaluado, es decir a menor diámetro de poro, menor es la permeabilidad.

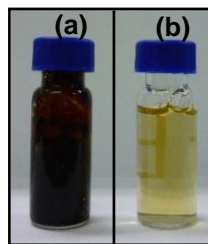
Se evidencia variaciones en las permeabilidades para todas las membranas utilizadas en los primeros 30 min (para la membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  la variación fue de 40%; para la membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  de 53%; para la membrana de 300 kDa de 53% y para la membrana de 150 kDa fue de 60%). A partir de los 30 min, las permeabilidades se mantienen en los mismos niveles. Este fenómeno también fue experimentado por Prieto *et al.* (2005), donde se reportaron pérdidas de permeabilidad de hasta un 45% para membranas de fibra hueca de polisulfona de 0,2  $\mu\text{m}$ , utilizando únicamente agua cruda. Este trabajo asocia las pérdidas de permeabilidad con el contenido de materia orgánica presente en el agua utilizada y la presión de trabajo. Otros factores que también podrían intervenir estarían relacionados con el tipo de membrana utilizada (geometría y material) (Akthakul, 2002).

De acuerdo con los resultados obtenidos por Kokkora *et al.* (2012), la microfiltración a 0,2  $\mu\text{m}$  permite la separación de las dos fases de la sangre (fracción celular y plasma de bovino). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio en cuanto al análisis fisicoquímico para los permeados de 0,2  $\mu\text{m}$  (materia seca 5,19% y proteína 6,49%) difieren notoriamente a los valores encontrados para el plasma de bovino (materia seca 10,3% y proteína 6,49%), además el color del plasma de bovino es considerablemente más claro que el obtenido en los permeados de dichas membranas (ver Figuras 4(b) y 5(b)). Por lo tanto, se puede inferir que la microfiltración de sangre cruda con membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ , no separa la sangre en fase celular y plasma como lo reportaba Kokkora *et al.*, (2012). Este comportamiento es debido posiblemente al tipo de bomba utilizada en cada uno de los estudios.

Con respecto a las permeabilidades obtenidas por Kokkora *et al.* (2012), éste reporta flujos de filtrado para la sangre cruda de  $6,6 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  con membranas de  $0,2 \mu\text{m}$ , que difiere notoriamente al obtenido en el presente estudio ( $37,6 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ). Esta diferencia es atribuida a la presión de operación (2,5 bar en el estudio de Kokkora *et al.* (2012)), al tipo de membrana utilizada y al área de transferencia de ésta.

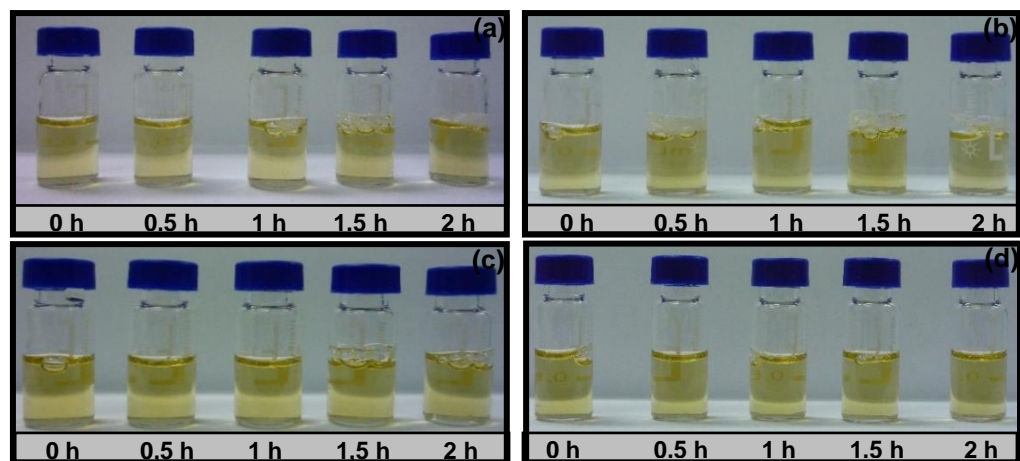
El estudio del diámetro de poro sobre los filtrados de hidrolizados de sangre, se inició con una prefiltración (recomendada para procesos de ultrafiltración), con el fin de reducir la carga de componentes de mayor tamaño molecular y evitar así, la rápida colmatación de la membrana (Forero y Vélez, 2013)(Santos, 2005)(Muñi *et al.*, 2005). Para dicha prefiltración se utilizaron membranas de  $0,2 \mu\text{m}$  (escogida a partir del estudio con sangre cruda).

En la Figura 7 se observa la apariencia de una muestra de hidrolizado de sangre y de su prefiltrado con membranas de  $0,2 \mu\text{m}$ . El hidrolizado de sangre era espeso, de color café oscuro, y tenía un olor característico fuerte. El filtrado del hidrolizado era más fluido, de una coloración ámbar y del mismo olor aunque menos acentuado.



**Figura 7. Hidrolizado de sangre de bovino obtenido a  $53^{\circ}\text{C}$ , pH de 8,34 y una concentración de enzima (Alcalasa 2,4 L) de 0,76 %p/p antes y después de la clarificación con membrana de  $0,2 \mu\text{m}$ , a  $50^{\circ}\text{C}$  y 1,5 bares de  $\Delta P_{TM}$  y velocidad de alimentación de 13 m/s (a) Hidrolizado de sangre. (b)Hidrolizado prefiltrado.**

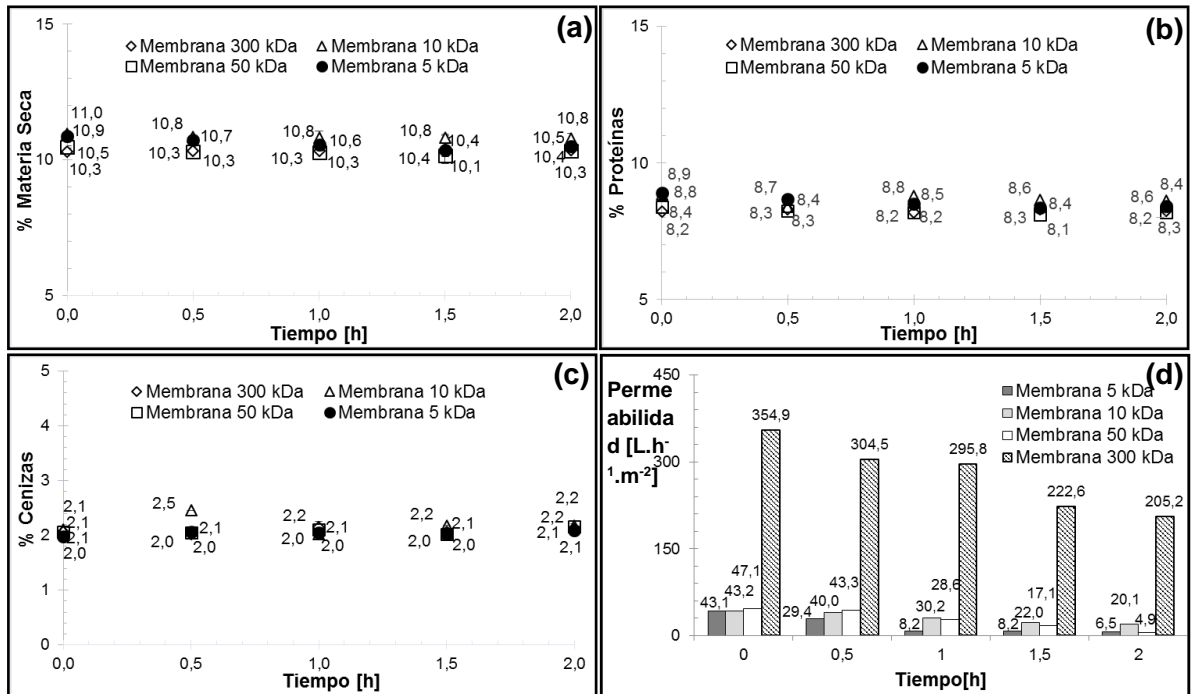
En la Figura 8 se muestra la evolución del color de los permeados obtenidos durante la filtración de los hidrolizados. En ésta, se evidencia que el diámetro de poro no tiene una influencia significativa en el aspecto (color y olor) de los permeados obtenidos.



**Figura 8. Evolución del color de permeados de prefiltrado de hidrolizados de sangre con membranas de diferentes diámetros de poros obtenidos a 50°C,  $\Delta P_{TM}$  1 bar y una velocidad de alimentación de 13 m/s en un tiempo de 2 h. (a) Permeado con membrana de 300 kDa. (b) Permeado con membrana de 50 kDa. (c) Permeado con membrana de 10 kDa. (d) Permeado con membrana de 5 kDa.**

La Figura 9 muestra los resultados de la cuantificación de la materia seca, cenizas, proteínas y permeabilidad de los permeados obtenidos para los prefiltrados de hidrolizados en la etapa de estudio de la influencia del diámetro de poro.

En la anterior figura se observa que las características fisicoquímicas (materia seca, cenizas y proteínas) obtenidas para estos permeados se mantienen constantes y similares para todos los diámetros de poro evaluados. La permeabilidad fue la única variable que se vio afectada por dicho parámetro, encontrando que la membrana de 300 kDa permeó aproximadamente 18 veces más, que la membrana de 50 kDa. En los estudios realizados acerca de la hidrólisis enzimática de sangre de bovino no se reportan valores para las propiedades fisicoquímicas presentadas en este estudio, por tal razón no es posible hacer una comparación de los mismos. Es importante señalar que este es el primer trabajo que reporta el seguimiento de estas propiedades fisicoquímicas.



**Figura 9. Composición de los permeados con membranas de 300 kDa, 50 kDa, 10 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar prefiltrados de hidrolizados de sangre a 50°C, 1 bar de  $\Delta P_{TM}$  y una velocidad de alimentación de 13 m/s durante 2 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteína. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.**

Lo evidenciado en las Figuras 8 y 9 muestra que las membranas no son selectivas para los compuestos presentes en los hidrolizados de sangre de bovino clarificados con membranas de 0,2  $\mu\text{m}$ .

Comparando estos resultados con los obtenidos de los permeados de sangre de bovino cruda, se observa que en estos últimos, existe una influencia del diámetro de poro en las características fisicoquímicas. Lo contrario ocurre con los permeados de hidrolizados de sangre que presentan las mismas características, tanto físicas como químicas, sin distinguir el tamaño de poro de la membrana.

Respecto al porcentaje de proteínas, los permeados obtenidos con membrana de 300 kDa utilizando sangre de bovino cruda presentaron un contenido de proteína, menor que en los obtenidos con hidrolizados de sangre (1,1% y 8,3%

respectivamente). Esto se debe posiblemente a la actividad enzimática realizada en la segunda fase, que produjo péptidos de menor tamaño molecular que las proteínas presentes en la sangre de bovino cruda.

### **3.2 ESTUDIO DE LA PERMEABILIDAD Y LAS CARACTERÍSTICAS DEL PERMEADO EN EL TIEMPO UTILIZANDO SANGRE DE BOVINO CRUDA E HIDROLIZADA.**

Para la fase que trabaja con sangre de bovino cruda se decidió realizar una prefiltración, con el objetivo de disminuir la colmatación evidenciada en la etapa anterior (debida a la carga orgánica).

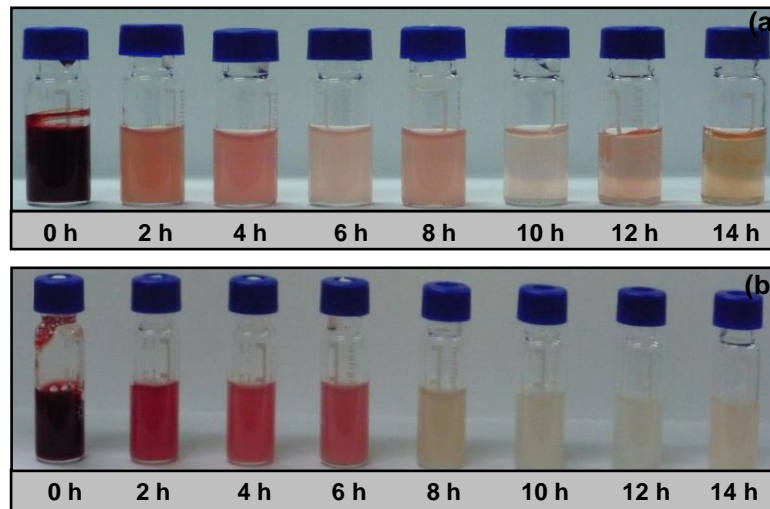
Los criterios para escoger la membrana a utilizar en la clarificación, fueron: mayor valor de permeabilidad, y que visualmente presentara una clarificación (en comparación con la sangre de bovino cruda). Se escogió el diámetro de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  ya que a pesar que la membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  presentaba mejores valores de permeabilidades, el permeado aún tenía una carga orgánica mayor (posibilidad de colmatación).

En la Tabla 3, se presentan los resultados fisicoquímicos de los prefiltrados de sangre de bovino cruda e hidrolizada con membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 3. Composición de los prefiltrados con membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  de sangre de bovino cruda e hidrolizada.**

<b>Componente</b>	<b>Prefiltrado 0,2<math>\mu\text{m}</math> Sangre cruda</b>	<b>Prefiltrado 0,2<math>\mu\text{m}</math> hidrolizado</b>
<b>% Agua</b>	92,5 $\pm$ 0,50	89,2 $\pm$ 0,04
<b>% Proteínas</b>	4,6 $\pm$ 0,13	8,7 $\pm$ 0,43
<b>% Lípidos</b>	0,2 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,01
<b>% Minerales</b>	1,3 $\pm$ 0,03	2,1 $\pm$ 0,06
<b>Hierro [mg/100 ml]</b>	14,1	2,8

La Figura 10 muestra la evolución de color de los permeados obtenidos a través del tiempo, con membranas de 300 kDa y 5 kDa para la primera fase.



**Figura 10. Evolución del color en el tiempo en permeados de 300 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino prefiltrada a 12°C, 1,5 bar de  $\Delta P_{TM}$  y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Permeados membrana de 300 kDa. (b) Permeados membrana de 5 kDa.**

En la Figura 10 (a) y (b) se observa que el color de cada una de las muestras va disminuyendo a medida que transcurre el tiempo de filtración. Esta disminución de color se asocia posiblemente a la disminución de la concentración del grupo hemo en los permeados. En relación a esto, Zapata (2006) reporta la formación de una capa orgánica sobre la membrana a través del proceso, que la hace más selectiva. La reducción de la intensidad de color presente en este estudio, puede ser atribuida a la formación de dicha capa.

La Figura 11 presenta los resultados de la cuantificación de materia seca, cenizas, proteínas y permeabilidades de los permeados a través del tiempo con membranas de 300 kDa y 5 kDa.

Al comparar los datos de los permeados de la membrana de 300 kDa y 5 kDa, se observa que no existe una diferencia significativa en los porcentajes de materia seca, cenizas y proteínas. Además en esta etapa se evidencia una retención significativa de materia seca (70% para membrana de 5 kDa y 80% para membrana de 300 kDa) y

proteína (99% para ambas membranas) durante el proceso. Lo contrario ocurre con las cenizas las cuales tienen un porcentaje de retención bajo 18%.

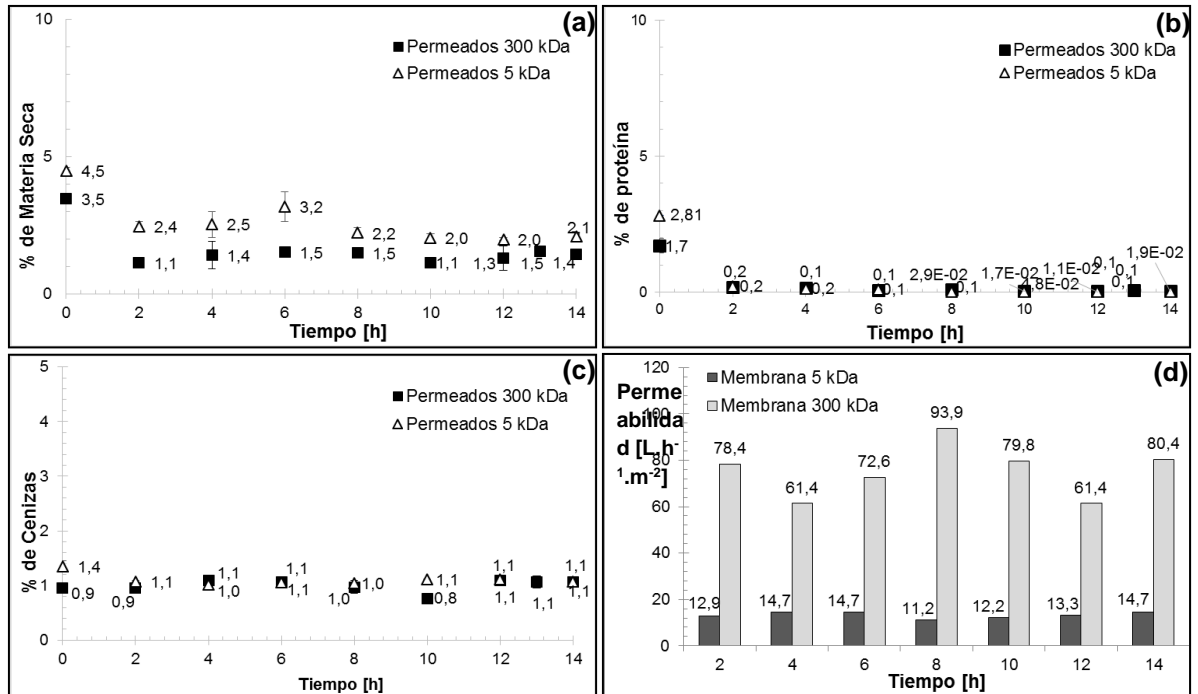


Figura 11. Composición de los permeados con membrana de 300 kDa y 5 kDa obtenidos al filtrar sangre de bovino cruda prefiltrada a 12°C, 1,5 bares de  $\Delta P_{TM}$  y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.

Este mismo estudio se realizó para los hidrolizados de sangre de bovino. La Figura 12 muestra la apariencia de cada uno de los permeados obtenidos durante las 14h de filtración.

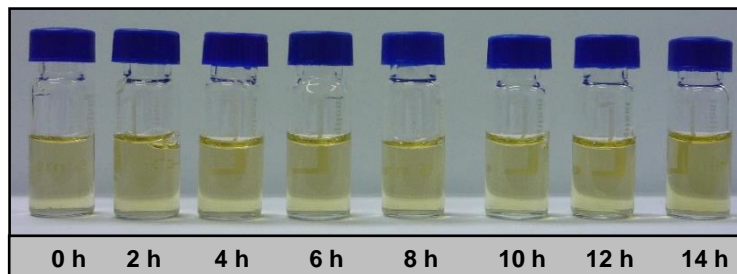


Figura 12. Evolución del color en el tiempo en permeados de 300 kDa obtenidos de la filtración de prefiltrados de hidrolizados de sangre de bovino a 50 °C, 1 bar de  $\Delta P_{TM}$  y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h.

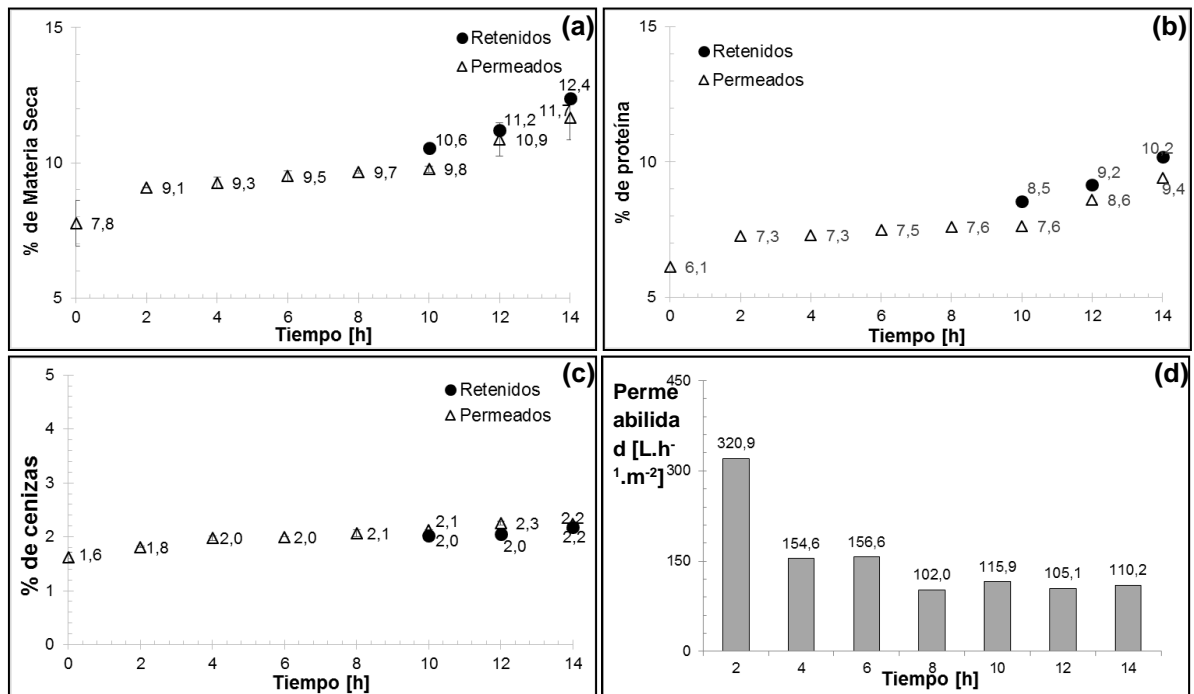
Contrario a lo observado durante la filtración de sangre cruda de bovino, en los hidrolizados no se observa ningún cambio en la apariencia de los permeados obtenidos a través del tiempo. Se podría decir que no existe formación de una capa que modifique las características del permeado en el tiempo (contrario a lo obtenido para la fase con sangre cruda).

La Figura 13 presenta los resultados del análisis fisicoquímico realizado a los permeados de 300 kDa de hidrolizados de sangre. En las 2 primeras horas se presenciaron un período de estabilización de la filtración (porcentajes de variación de materia seca y proteínas de 22%, cenizas de 26%). A partir de esta hora se evidenció un aumento progresivo de las composiciones. Dicho aumento se debe a pérdidas de volumen por evaporación en la alimentación; más notorio después de las 10 h cuando se comenzó a recolectar todo el filtrado obtenido (generando disminución del volumen de alimentación).

Adicionalmente, se observa que no existe una diferencia significativa entre la composición de retenidos y permeados (la membrana de 300 kDa no es selectiva para los hidrolizados clarificados con membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  como fue evidenciado anteriormente).

Por otra parte, la permeabilidad de la membrana en esta etapa fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo de filtración, perdiendo un 52% de su permeabilidad antes de estabilizarse al cabo de 4 h (ver Figura 13d). Esto también fue observado anteriormente durante la etapa de estudio del diámetro de poro (pérdida de permeabilidad de 53% para la membrana de 300 kDa). Es importante mencionar que este fenómeno corresponde a una estabilización de la membrana como lo reporta Prieto *et al.* (2005) y no a una colmatación de ella ya que la permeabilidad se estabilizó y se mantuvo durante las 12 h siguientes (operando a la misma temperatura y presión). Según Najarian y Bellhouse (1996), dicho fenómeno

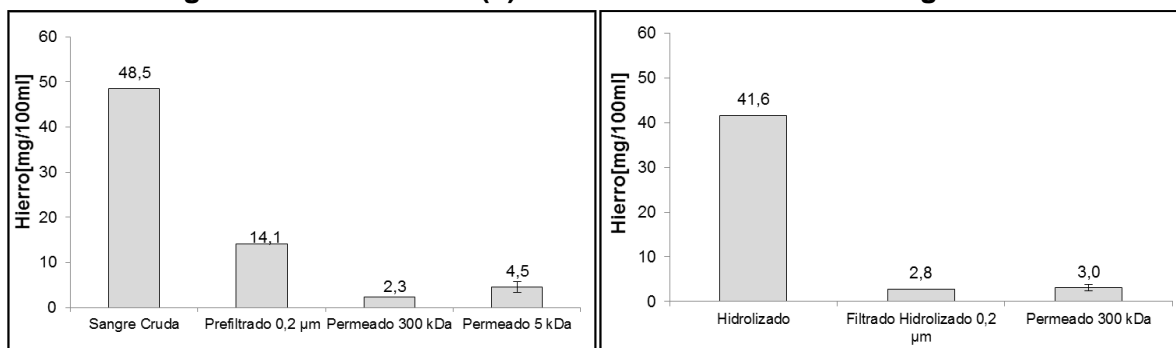
puede disminuirse aumentando el caudal de alimentación del sistema; lo que aumentaría la velocidad de arrastre sobre la superficie de la membrana.



**Figura 13. Composición de los permeados de membrana de 300 kDa obtenidos al filtrar prefiltrados de hidrolizado de sangre de bovino a 50°C, 1 bar de  $\Delta P_{TM}$  y velocidad de alimentación de 13 m/s durante 14 h. (a) Porcentaje de materia seca. (b) Porcentaje de proteínas. (c) Porcentaje de cenizas. (d) Permeabilidades.**

En la Figura 14 se presenta la concentración de hierro en las diferentes muestras analizadas durante las dos fases de estudio. En ésta se puede observar que las membranas son selectivas al hierro ya que retienen un gran porcentaje de este mineral (porcentajes de retención para prefiltrados de sangre de bovino cruda de 71% y de hidrolizados de sangre de 93%), posiblemente porque el hierro está asociado a la hemoglobina (proteína de alto tamaño molecular).

**Figura 14. Concentración de hierro en las muestras analizadas en la fase 1 y 2. (a) Fase 1 - Sangre de bovino cruda. (b) Fase 2 - Hidrolizados de sangre.**



Al evaluar dicha concentración en el permeado obtenido con membrana de 300 kDa se observa que se redujo a 2,3 mg/100 ml; esto es aproximadamente 7 veces la concentración del prefiltrado de sangre cruda. No se encontraron artículos referentes a este tema que nos permitieran hacer una comparación con los resultados obtenidos.

En cuanto a los hidrolizados de sangre de bovino encontramos que la única reducción de la concentración de este mineral se produjo en la prefiltración con membranas de 0,2  $\mu$ m. La concentración de hierro del prefiltrado hidrolizado fue menor que el prefiltrado de sangre de bovino cruda, debido posiblemente a la dilución ocasionada por la adición de soluciones de NaOH (regulación del pH de hidrólisis) y HCl (desactivación de la enzima) durante la etapa de hidrólisis.

Luego de realizar el secado a 50°C de los permeados con membrana de 300 kDa, se obtuvo un producto seco tanto para la sangre cruda como para los hidrolizados de sangre. En la Tabla 4 se encuentran los resultados del análisis fisicoquímico obtenido de los permeados secos. Adicionalmente, en la Figura 15 se puede observar la apariencia de cada uno de ellos.

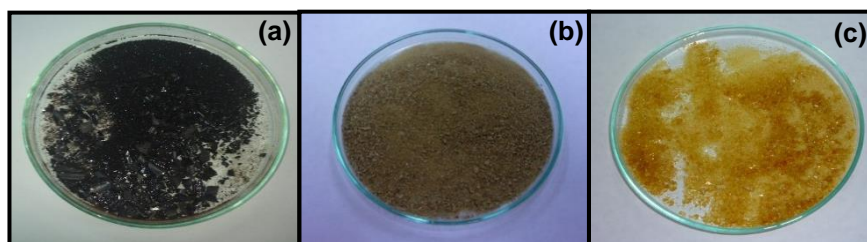
El filtrado de hidrolizado de sangre en polvo, presentó una textura pegajosa y una coloración más brillante que la que presentó el de sangre cruda. En ambos casos, las características físicas de estos, los hacen atractivos para posibles aplicaciones

como aditivo en la industria de alimentos, en comparación con la sangre de bovino seca (Figura15 (a)) que presenta una tonalidad muy oscura.

**Tabla 4. Composición de los permeados secos obtenidos con membranas de 300 kDa a 50°C para la fase uno (sangre de bovino cruda) y la fase dos (hidrolizados de sangre de bovino).**

Composición en base seca	Filtrado de sangre de bovino cruda en polvo	Filtrado de hidrolizado de sangre en polvo
% Proteínas	7,7 ± 0,34	68,3 ± 0,25
% Grasas	0,12 ± 0,01	0,3 ± 0,02
% Cenizas	87,3 ± 0,35	23,6 ± 0,31
Hierro [mg/100 g]	158,6	29,5

Dentro de las aplicaciones potencialmente interesantes, está la de obtener hierro a partir de sangre de bovino cruda e hidrolizada. Debido a que la adición de este mineral a los alimentos permitiría disminuir los riesgos de padecer anemia en la población más vulnerable, especialmente niños y mujeres embarazadas; el hierro orgánico es de fácil absorción y asimilación por parte del cuerpo humano (Nogueira *et al.*, 1992).



**Figura 15. Apariencia de los productos obtenidos luego del secado a 50°C. (a) Sangre de bovino cruda seca (b) Producto seco de la primera fase. (c) Producto seco de la segunda fase.**

## CONCLUSIONES

Este trabajo permitió realizar un estudio sobre el efecto de diámetro de poro en las permeabilidades y las características en el tiempo de los permeados, que no estaban reportados en la literatura hasta el momento. Igualmente, se establecieron los protocolos de funcionamiento y lavado para la filtración con membranas de soluciones de sangre de bovino cruda e hidrolizada.

Para la sangre de bovino cruda, en el estudio del efecto del diámetro de poro sobre las características de sus permeados, se pudo concluir que esta variable condiciona las características fisicoquímicas de éstos; ya que al disminuir el tamaño de poro, aumenta la retención de proteína por la membrana (retención comenzando en 71% para membranas de diámetro de poro de 0,45µm hasta retención de 97% para membrana de 150 kDa). Para el estudio de la permeabilidad en el tiempo, se presentó en promedio una retención de materia seca de 75% ± 0,25 y de proteínas de 98% ± 0,04 durante las 14 h de filtración, para las dos membranas utilizadas (300 kDa y 5 kDa). Esta retención es debida posiblemente al tamaño molecular de las proteínas presentes en el prefiltrado de sangre de bovino cruda. En relación a los minerales, ninguna de las membranas fue selectiva, dejando pasar estos compuestos a través de la membrana.

Para los hidrolizados de sangre, en el estudio del diámetro de poro (prefiltrados con membrana de 0,2 µm) no se observó una influencia significativa de esta variable en las características fisicoquímicas de los permeados, las cuales fueron similares (contenido de materia seca 11%, proteína 9% y cenizas 2%). Mostrando que la membrana de 0,2 µm utilizada para la prefiltración logró retener la mayoría de los compuestos que podrían ser removidos por ultrafiltración. Para el estudio de la permeabilidad en el tiempo, se presentó una similitud en las características fisicoquímicas de los permeados y de los retenidos con membranas de 300 kDa, mostrando que la filtración con dicha membrana no es necesaria.

El filtrado de sangre de bovino cruda en polvo obtenido con membrana de 300 kDa presentó un alto porcentaje de minerales (87%) asociados a las cenizas. Para el caso del filtrado de hidrolizado de sangre en polvo obtenido con membrana de 300 kDa, se obtuvo un polvo rico en proteínas (68%) y minerales (24%), además de una coloración ámbar. En ambos casos las características mejoradas de éstos con respecto a la sangre cruda permiten considerarlos para estudios futuros de valorización sobre su aplicación como aditivo para la industria alimenticia.

## ESTUDIOS A FUTURO

Es necesario realizar la determinación de la distribución de tamaños moleculares presentes en los permeados a través del proceso, con el fin de establecer el diámetro de poro de la membrana para la separación de estos.

Se recomienda realizar estudios enfocados al análisis de la influencia del tipo de bomba de alimentación sobre las características fisicoquímicas de los permeados de sangre cruda e hidrolizada.

En busca de realizar estudios de los permeados de hidrolizados de sangre en la industria alimenticia, es necesario utilizar otro tipo soluciones básicas y ácidas para mantener las condiciones de hidrólisis y su detención. Adicionalmente, se recomienda realizar una desalinización de dichos filtrados para disminuir la carga de sales que podrían tener un efecto negativo sobre la salud.

Para obtener mayores productividades, se recomienda aumentar la superficie membranaria utilizada en este trabajo de grado, considerando el tipo de efluente a utilizar.

Se recomienda la implementación de otros tipos de secado para el filtrado final, como lo son el secado por aspersion o la liofilización. Además, se propone realizar una concentración previa antes de dicho secado; podría considerarse la evaporación de película para tal fin.

## BIBLIOGRAFÍA

AKTHAKUL, W. & MAYES, A. (2002). Noncircular pores on the surface of asymmetric polymer membranes: Evidence of pore formation via spinodal demixing. *Journal of Membrane Science* 208, 147-155.

ALENCAR, F. (1983). Estudos da recuperação das proteínas do plasma bovino por complexação com fosfatos e a sua utilização em produtos cárneos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

ASENJO, J., AMAR, M. & CARTAGENA, N. (1985). Use of bovine heme iron concentrate in the fortification of biscuits. *J. FoodSci*,

BENAVENTE, J., ARIZA, M. & CAÑAS, A. (2000). Evaluación de la colmatación de una membrana mediante medidas eléctricas y de la composición química de su superficie. *Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio*.

BENÍTEZ, B., BARBOZA, Y., BRACHO, M., IZQUIERDO, P., ARCHILE, A., RANGEL, L. & MÁRQUEZ, E. (1999). Efecto del pH y concentración de las proteínas sobre la propiedad de gelación de la sangre animal. *Revista Científica* IX, 190-195.

BENITO, J., CONESA, A. & RODRÍGUEZ, M. (2004). Membranas Cerámicas: Tipos, métodos de obtención y caracterización. *Boletín de la sociedad española de Cerámica y Vidrio* 43.

BIZZOTTO, C., CAPOBIANGO, M., PINTO, M. (2005). Evaluation of functional properties of a blood protein. *Pakistan Journal of Nutrition* 4.

CHAUX, G., ROJAS, G. & BOLAÑOS, L. (2009). Producción más limpia y viabilidad de tratamiento biológico para efluentes de mataderos en pequeñas localidades. *Facultad de Ciencias Agropecuarias 7*.

CUI, Z. & MURALIDHARA, H. (2010). *Membrane Technology*. Editorial Butterworth – Heinemann, 1a Edición.

DÁVILA, E. (2006). *Advances in animal blood processing: Development of a biopreservation system and insights on the functional properties of plasma*. Tesis Doctoral, Universidad de Girona.

DEPARTAMENTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. Sacrificio de ganado total nacional y regional – vacunos, porcinos y otras especies - Diciembre 2012.

DUARTE, R., SIMOES, C. & SGARBIERI, V. (1999). Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 231-236.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. (1997). *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal*.

FORERO, F. & VÉLEZ, P. (2013). Optimización de la concentración por evaporación osmótica del jugo de maracuyá. *Dyna* 179, 90-98.

GÓMEZ, L., FIGUEROA, O. & ZAPATA, J. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa 2,4 L. *Información Tecnológica* 24, 33-42.

GUTIÉRREZ, S. & GONZÁLEZ, A. (1997). Utilización de corpúsculos bovinos y porcinos en polvo en productos para regímenes especiales de alimentación. II Taller nacional de hemoderivados y otros productos para la prevención de la anemia férrica. *Instituto de investigaciones para la industria alimenticia*.

HOYO, P., MOURE, F., RENDUELES, M. & DÍAZ, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by Ion Exchange and Ultrafiltration. *Meat Science*, 402-410.

HOYO, P., RENDUELES, M. & DÍAZ, M. (2008). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science* 78, 522-528.

ISAZA, J., LONDOÑO, L., RESTREPO, D., CORTES, M. & SUÁREZ, H. (2010). Producción y propiedades funcionales de plasma bovino hidratado en embutido tipo salchichón. *Revista Colombia de Ciencias Pecuarias* 23, 199-206.

KOKKORA, M., PETROTOS, K., GKOUTSIDIS, P. & MPOULMPOS, C. (2012). Application of membrane technology to slaughterhouse blood to produce edible powdered protein mixture. *Journal of Membrane and Separation Technology* 1, 35-42.

MÉNDEZ A. (2011). Adición de hierro Hemo, proveniente de hemoglobina bovina a un chocolate de consumo directo. Universidad Industrial de Santander, Colombia.

MONROY, R. (2013). Valorización de residuos de sangre de bovino mediante hidrólisis enzimática integrando procesos con membranas. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química.

MUÑI, A., PÁEZ, G., FARÍA, J., FERREY, J. & RAMONES, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica XV*, 361-367.

NAJARIAN, S. & BELLHOUSE, B. (1996). Effect of liquid pulsation on protein fractionation using ultrafiltration processes. *J. Membr. Sci* 114, 245 – 253.

NOGUEIRA, N., COLLI, C. & COZZOLINO, S. (1992). Controle da Anemia Ferropriva em Pré-Escolares por Meio da Fortificação de Alimento Com Concentrado de Hemoglobina Bovina (Estudo Preliminar). *Cad. Saúde Públ* 8, 459-465.

NOVOZYMES. Ficha técnica Alcalase Grado Alimenticio.

PANYAM D. & KILARA A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Sci. Tech.*

PARK, K. & HYUN, C. (2002). Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 633-638.

PEARSON, D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos; Acribia, S.A. Zaragoza.

PRIETO, M., CARRILLO, A. & RODRÍGUEZ, M. (2005). Ensayos preliminares de microfiltración directa para potabilización de aguas superficiales en la Sabana de Bogotá. *Revista de ingeniería*.

PROCURADURÍA GENERAL DE LA NACIÓN. (2007). Seguimiento a las plantas de sacrificio de ganado bovino y porcino en Colombia.

REPÚBLICA DE COLOMBIA, CONGRESO DE COLOMBIA, Decreto 1036 de 1991.

ROCHA, B. (2006). Alternativas de utilización del plasma y la globina de la sangre de bovino, México.

RODRÍGUEZ, L., PÉREZ, A. & CAMPDERRÓS, M. (2009). Inulin like lyoprotectant of bovine plasma proteins concentrated by ultrafiltration. *Food Research International*.

SANTOS, A. (2005). Estudio de tratamiento de un agua con alto contenido en silicatos de zirconio mediante Microfiltración y Ultrafiltración. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

SILVA, J. & CHOCONTÁ, O. (2007). Diseño experimental para la construcción de un prototipo deshidratador de sangre bovina. *AVANCES Investigación en Ingeniería*.

SOTTO, A. (2008). Aplicación de la tecnología de membranas de nanofiltración y ósmosis inversa para el tratamiento de disoluciones acuosas de compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos. Universidad Rey Juan Carlos.

WALKER, J. (2002). The Protein Protocols Handbook. 2ª Edición, Editorial Humana Press.

ZAMORA, R. MONTAÑEZ, J. RODRÍGUEZ, H. & VENEGAS, J. (2012). Uso potencial de la sangre de bovino como fuente proteica en la elaboración de dietas para camarón blanco. *XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*, México.

ZAPATA, J. (2006). Efecto de la limpieza química en la permeabilidad de membranas cerámicas de ultrafiltración. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.