

Diseño de un procedimiento para la obtención y caracterización de disoluciones de Hemo purificadas

Maritza González-Pérez, José Alberto Gómez-Pérez*, Yanisleydis Otero-Cabrera, Yenisleidy Revilla-Fernández.

Centro Nacional de Biopreparados. Laboratorios de Reconstituyentes, carretera Beltran Km ½ Bejucal, Mayabeque. *Centro de Inmunología Molecular.maritzaglez@biocen.cu

Recibido: 3 de enero de 2016.

Aceptado: 29 de marzo de 2016.

Palabras clave: hemo, purificación, diálisis, hemoglobina bovina, caracterización.

Key words: heme, purification, dialysis, bovine hemoglobin, characterization.

RESUMEN. Los productos que contienen hierro en forma de hemo (PM-616 Da), son útiles para el tratamiento y prevención de la anemia. El objetivo de este trabajo fue diseñar un método para obtener una disolución de hemo, separar sus fracciones y caracterizarla con técnicas espectroscópicas. Esta disolución, se obtuvo a partir de sangre bovina estéril, utilizando métodos físicos y químicos. Para separar por tamaño las moléculas que la componen, se utilizaron membranas de diálisis de 1 000 Da, 6-8000 Da y 15 000 Da y tubos de centrifuga Amicón con membrana de 10 000 Da. Se emplearon dos lotes ajustados a pH-4,4 y 5,0 respectivamente. La disolución dializada se trató con HNO₃ 86 % y se concentró para determinar hierro (Fe) por Absorción atómica AA. La diálisis se realizó con 2 L de agua destilada y se concentró por calor, tratándose igualmente con HNO₃. La pureza se determinó por espectrometría de masa (EM) empleándose como patrón la hematina porcina (PM - 633,49 Da, Sigma). Como resultado, el hidrolizado a pH - 4,4 obtuvo un 82,32 % de moléculas menores de 1 000 Da, 2,72 % entre 1 000 y 6 - 8 000 Da, 4,24 % entre 6 - 8 000 y 15 000 Da, y 10,72 % por encima de 15 000 Da. Esta última fracción se atribuye a agregados que pudiera presentar el hemo en forma monomérica. En conclusión, se obtuvo una disolución de hemo asociado a péptidos, menores de 1 000 Da con alto grado de pureza demostrado por EM.

ABSTRACT. Products containing iron as heme (MW-616 Da), are useful for the treatment and prevention of anemia. The objective of this work was to design a method to obtain a solution of heme, separate the fractions and to characterize it, by spectroscopic techniques. This solution was obtained from sterile bovine blood, using physical and chemical methods. To separate molecules by size composing, dialysis membranes 1000 Da, 6-8000 and 15,000 Da and centrifuge tubes membrane Amicon 10,000 Da were used. Two batches adjusted to pH 4.4 and 5.0 respectively were used. The dialyzed solution was treated with 86 % HNO₃ and concentrated to determine iron (Fe) by atomic absorption (AA). Dialysis was performed with 2 L of distilled water and concentrated by heat, a treated as the same form with HNO₃. Purity was determined by mass spectrometry (MS) being used as a standard swine hematin (PM-633.49 Da, Sigma). As a result, the hydrolyzate to pH 4.4 obtained a 82.32 % of molecules less than 1 000 Da, 2.72 % between 1000 to 6-8 000 Da, 4.24 % between 6 - 8 000 and 15 000 Da, and 10.72 % above 15 000 Da. This last fraction is attributed to aggregates that could present the heme in monomeric form. In conclusion, it was obtained with this method, a solution with 82 % of heme associated to peptides, lesser than 1 000 Da, with a high degree of purity, demonstrated with MS.

INTRODUCCIÓN

La anemia por deficiencia de hierro (Fe) es considerada hoy en día un problema de salud por la incidencia de la misma en la población mundial y en especial en los países en vías de desarrollo.¹⁻³

La anemia tiene como origen diversas causas. Existen anemias ferropénicas, por bajo consumo de hierro; anemias por enfermedades crónicas que producen mala absorción intestinal (Ej: enfermedad celíaca, enfermedad renal crónica, entre otras); también, se originan anemias provocadas por fallos genéticos en los cuales se sintetiza el grupo hemo con defectos, por lo cual el mismo no puede utilizarse en la síntesis de hemoglobina (Ej: las porfirias).⁴⁻⁶

Existen numerosos medicamentos por vía oral, para combatir las anemias ferropénicas a base de hierro iónico y hemínico; éste último tiene mayor biodisponibilidad que el hierro iónico.⁷ También aparece un grupo de inyectables a base de hierro iónico⁷⁻²⁷ que cumplen la función de combatir la anemia por vía parenteral, como por ejemplo: hierro dextrana, hierro sacarato, hierro gluconato, etc., los cuales tienen como desventaja que presentan numerosas reacciones adversas, por lo que no todos los pacientes pueden hacer uso de los mismos.^{8,9}

El hierro hemínico por vía parenteral, solo aparece en el mercado en forma de Panhematina y Normosang, productos utilizados para el tratamiento de las Porfirias. Estos productos tienen la ventaja de que, al ser elaborados con hierro hemínico, se reducen considerablemente las reacciones adversas que pudieran producir, además se ofrece al organismo la molécula de hemo de forma natural, la cual es utilizada con más facilidad por el mismo.¹⁰⁻¹²

El laboratorio de Desarrollo de reconstituyentes y antianémicos del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen), se encuentra trabajando en la obtención de una disolución de hemo semi – purificada, con vistas a la elaboración de un producto con hierro hemínico, apto para ser administrado por vía parenteral a las personas afectadas por anemia por mala absorción y por enfermedades inflamatorias crónicas; que produzca menos reacciones adversas que el hierro iónico y con una mayor biodisponibilidad para el organismo¹³⁻¹⁵

En estudios anteriores, este proceso fue sometido a revisión y optimización, con vistas a aumentar el rendimiento del mismo; por tanto, nuestro trabajo tiene como objetivo lograr la caracterización de la disolución obtenida tras varios procesos de purificación, combinando métodos físicos y químicos, con la ayuda de métodos espectrométricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

-Sangre bovina estéril (Lote 3046-6)

MÉTODOS

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL CONTROL DE LOS PROCESOS DE OBTENCIÓN DE DISOLUCIÓN DE HEMO

Técnica cianometahemoglobina. Se empleó el reactivo Hemotest (Helfa diagnóstico).¹⁶

Lectura y Barrido espectrofotométrico. La lectura se realiza a 280 nm para determinar la presencia de proteínas y el barrido espectrofotométrico se realiza desde 380 nm hasta 440 nm para comprobar que a 405 nm ocurre el mayor valor de absorbancia para el grupo hemo en este intervalo, que es el correspondiente a la región del espectro (Banda Soret) donde aparece la banda de absorción para el grupo "hemo"¹⁷; realizándose las lecturas en espectrofotómetro UV – visible (Génesis 10 SUV-VIS, Alemania).

Cálculos de la concentración teórica de hemo y hierro. Se calcula en base a la masa atómica de la Hb (65 000 Da) donde el grupo hemo corresponde al 3,85 % de la misma y el contenido de hierro es un 0,35 %, si el lote de sangre utilizado tiene 166 g / L de Hb, contendrá 6,39 g de hemo y 0,581 g de hierro.

Método para determinación de la concentración de hierro por Absorción atómica (AA).¹⁸ Se utiliza una curva patrón de disolución estándar de hierro (Merck, 1000 ± 2 mg / L) y se preparan cinco puntos a las concentraciones de 1; 5; 10; 15 y 20 mg / L (Espectrofotómetro, Shimadzu, Japón)

Espectrometría de Masa (EM).¹⁹ Se utilizó como patrón hematina porcina p.a. en cristales, (Sigma). Se probaron tres matrices diferentes obteniéndose los mejores resultados en la que se utilizó el amoníaco con la cual se pudieron determinar los espectros de fragmentación de cada una de las variantes analizadas, empleando un Espectrómetro de Masa (Shimadzu Biotech Axima, Japón).

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE HEMO SEMI – PURIFICADA

Para los experimentos se empleó sangre bovina, con una concentración de 166 g / L. En el experimento se utilizaron dos mezclas de disolución de hemo obtenidos a partir de un mismo lote de sangre, pero acidificados en el proceso de hidrólisis a pH diferentes (pH 4,4 y pH 5,0) con el fin de realizar iguales procesos de diálisis en ambos casos y comparar los resultados obtenidos.

Obtención y lavado de eritrocitos.¹⁵ El plasma fue separado de los eritrocitos por centrifugación a 2 500 r/min por 10 min, y a continuación se lavaron tres veces con NaCl al 1,2 %, centrifugándose a 2 500 r/min por 10 min. Para medir la efectividad de la calidad de los lavados se midió la conductividad a los sobrenadantes hasta alcanzar en el tercer lavado una conductividad similar a la de la disolución salina empleada en los mismos.

Choque hipotónico. Se midieron 5 mL de pellet obtenido, se colocaron en un vaso de precipitado de 100 mL, se le añadieron 50 mL del agua destilada con una agitación suave por 30 min, centrifugándose a 4 500 r/min y 4 °C para la liberación de la Hb y separación de los detritos celulares. Se colectó el sobrenadante determinándose la concentración de hemoglobina y la lectura en espectrofotómetro a 280 nm y 405 nm.

Método de precipitación de proteínas por acidificación con HCl (0,5 N). Se midieron 70 mL de disolución de hemoglobina obtenida a partir del método de Choque hipotónico y se dividieron en siete alícuotas de 10 mL, a las que se les ajustó el pH con HCl 0,5 N. Se ajustaron a pH- 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,6; 4,8 y 5,0 respectivamente, luego se centrifugaron a 10 000 r/min por 30 minutos, y al sobrenadante obtenido se realizó el barrido espectrofotométrico, en la zona de la Banda Soret (380 – 440 nm) para escoger el pH al que se obtiene el pico con la mayor absorbancia para el grupo hemo (en este caso a 405 nm) y se realizó a continuación la precipitación de proteínas por calor.

Método de precipitación de proteínas por tratamiento con calor. Los sobrenadantes obtenidos de las muestras acidificadas, se sometieron a tratamiento térmico en baño termostataado por 2 h a 60 °C, para precipitar el resto de las proteínas que pudieran quedar en suspensión y que no están asociadas al grupo hemo;¹³ se centrifugaron a 10 000 r/min por 30 min a 4 °C, se recogieron los sobrenadantes y se efectuó el barrido espectrofotométrico, determinándose el valor máximo de absorbancia para el grupo hemo en cada uno de los ajustes de pH efectuados desde pH-4,0 hasta pH-5,0. De acuerdo a los resultados obtenidos, se escogieron para el trabajo a mayor escala (100 mL de disolución de Hb), los pH 4,4 (máxima absorbancia para el grupo hemo) y 5,0 (con menor absorbancia) con vistas a determinar la influencia de esta variación del pH con relación a la presencia de hemo en disolución. Para realizar la acidificación, se realizó el mismo tratamiento de ajuste de pH y precipitación por calor para ambas disoluciones. Se realizó el barrido espectrofotométrico comprobándose la presencia de hemo en los mismos y se almacenaron las disoluciones de 2- 8 °C hasta su purificación por columna.

Método de purificación por columna con Sephadex G-25M.²⁰ La purificación de los sobrenadantes obtenidos, se realizó, con Sephadex G-25M, en columna de vidrio (50 cm x 2,5 cm de diámetro (Pharmacia, Alemania) y bomba peristáltica LKB (Pharmacia, Alemania). La columna se equilibró con PBS a pH 5,0. Se aplicó 1 mL de muestra en cada corrida, con un flujo de 65 mL / h, la disolución de corrida fue un gradiente de PBS (pH-5) / agua destilada (pH-5) y las fracciones se colectaron a razón de 4 mL por tubo, a temperatura del laboratorio (19 °C – 22 °C) y se guardaron entre 2 °C y 8 °C en tubos con tapa de rosca. Con este proceso se realizaron 18 corridas a pH- 4,4 y a pH-5,0 respectivamente con las que se realizaron mezclas de los volúmenes obtenidos de cada proceso por separado, efectuándose el barrido espectrofotométrico, para determinar la presencia de hemo y también se mineralizó una alícuota de cada una para determinar el contenido de hierro por AA.

DIÁLISIS Y CONCENTRACIÓN DE LAS VARIANTES UTILIZADAS

Las mezclas de las disoluciones de hemo purificado se dividieron como sigue. La mezcla a pH 4,4 utilizó 100 mL de disolución de hemo en cada uno de los procesos de diálisis mientras que la mezcla a pH 5,0 utilizó volúmenes de 40 mL debido a pérdidas por manipulación durante el proceso, ambas con igual concentración (500 µg / 100 mL) de Fe determinado por AA. Para las diálisis se emplearon 2 L de agua destilada en todos los casos. En ambas variantes con tubos de centrifuga Amicon se utilizaron 100 mL de disolución de hemo y los lavados se efectuaron con unos 600 mL de agua destilada. El resto del volumen se utilizó, en determinar los parámetros de la disolución de hemo antes del proceso, para compararlos con los obtenidos al final del mismo mediante los ensayos de: AA, contenido de proteínas por Lowry²¹ y Barrido espectrofotométrico.

El cálculo se realizó restando, a la concentración de hierro inicial de la muestra sin dializar, la suma de las concentraciones de Fe calculadas por AA (retenida dentro de la membrana de diálisis y la concentración de Fe de la disolución del agua de dializado). En el proceso de centrifugación por Amicón se realizaron los cálculos de igual manera que en los dializados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que muchas de las técnicas utilizadas en este trabajo, han sido descritas por diferentes autores,^{13,14} la combinación de varias de ellas y sus optimizaciones han conformado un método, que con pocos recursos permitió la obtención de una disolución de hemo semi-purificada y su caracterización. Por tanto, se cumplió el objetivo de este trabajo ya que la disolución obtenida, aunque proviene de una hidrólisis inespecífica logró un alto contenido de moléculas de hemo asociadas a péptidos con bajo peso molecular.

Tanto la obtención como la caracterización de la disolución de hemo semi-purificada, tuvo en cuenta la realización de ajustes y optimizaciones de los métodos, que permitieron fijar parámetros específicos para obtener una disolución de este tipo¹⁵. Los controles de proceso fueron realizados en todos los pasos desarrollados y se comprobó mediante espectrometría y espectroscopia¹⁸⁻¹⁹ la presencia del grupo hemo en dicha disolución.

En los procesos de diálisis (tablas 1 y 2) el pH se comportó de forma ascendente como se esperaba, debido a que el pH del agua utilizada para efectuarlos (6,57) es más alto que el pH de partida de las muestras (5,39).

Tabla 1. Resultados de los controles de las diálisis de disolución de hemo a pH 4,4

Muestras	pH	Lowry (µg/mL)	Abs (nm)	280	Abs (nm)	405	Conductividad (µS/cm)
Sin dializar	5,39	0,52	(Dil 0,442	1:2)	1,986		17 200
Dial 10 000	5,77	0,24	(Dil 0,685	1:2)	1,907		520
Dial 6-8 000	5,79	0,23	(Dil:1:2) 0,604		2,348		49,7
Dial 15 000	5,71	0,06	(Dil 0,555	1:2)	2,396		45,7
Amicón	5,97	0,79	(Dil 0,240	1:4)	1,197		12,12
Agua destilada	6,57	-	-		-		12,73

En cuanto a la concentración de proteínas determinada por la técnica de Lowry ²¹ disminuyó con el aumento de la porosidad de las membranas de diálisis utilizadas, siendo un poco más alta en el caso de las membranas de 10 000 Da, correspondientes al proceso de centrifugación por Amicon, lo que sugiere que lo retenido en la membrana de 10 000 Da incluyó a las proteínas de mayor peso molecular.

Tabla 2. Resultados de los controles de las diálisis de disolución de hemo a pH 5,0

Muestras	pH	Lowry (µg/mL)	Abs (nm)	280	Abs (nm)	405	Conductividad (µS/cm)
Sin dializar	5,39	0,52	(Dil 0,442	1:4)	1,986		1442
Dial 10 000	5,95	0,32	(Dil 0,437	1:2)	1,553		493
Dial 6-8 000	5,81	0,27	(Dil 0,587	1:2)	1,332		76,7
Dial 15 000	6,13	0,24	(Dil 0,634	1:2)	1,099		85,5
Amicón	5,48	0,98	(Dil 0,528	1:4)	2,387		10,36
Agua destilada	6,55	-	-		-		11,24

También los resultados indican que la hidrólisis proteica fue menor a pH 5,0 que a pH 4,4. (Tablas 1 y 2)

Las lecturas a la longitud de onda de 280 nm corroboran la presencia en la disolución de proteínas, mientras que las lecturas a 405 nm (punto de mayor absorbancia) evidencian la presencia del grupo hemo en la misma, ya que la Banda Soret, específica para este grupo ¹⁷, se presenta en el intervalo de (380 nm – 440 nm). (Tablas 1 y 2)

La conductividad final comparada con la inicial, disminuyó proporcionalmente con la disminución de la porosidad de la membrana utilizada en cada proceso, aproximándose a la conductividad del agua destilada utilizada, lo que sirvió para determinar el tiempo final de cada proceso de dializado y centrifugado respectivamente. (Tablas 1 y 2)

La concentración de hierro obtenida en cada proceso fue calculada a partir de la AA tanto por (µg de Fe total) como en porcentaje, con vistas a comparar las dos variantes utilizadas, puesto que se partió de volúmenes diferentes de las mismas, pero conteniendo igual concentración. Se puede observar que en todas las variantes se tuvo en cuenta la pérdida por evaporación (Tabla 3) la cual ocurre, debido a la reducción del líquido de diálisis mediante ebullición, lo que hace que el hierro quede adherido a las paredes del cristal y no pueda ser recuperado

Tabla 3. Comparación de la concentración de Fe Hemo obtenido en los procesos de dializado y centrifugación por Amicón a pH 4,4 y 5,0.

Muestras analizadas	pH-4,4 Conc.Fe	pH-4,4	pH-5,0 Conc. Fe	pH 5,0
	(µg)	(%)	(µg)	(%)
Conc. Inicial del pool	500	-----	200	-----
Conc membrana 1 000 Da	88,4	17,68	81,2	40,6
Agua de diálisis	83,2	16,64	18,2	9,1
Pérdida por evaporación	328,4	65,68	150,6	75,3
Conc membrana 6-8 000 Da	74,8	14,96	72,6	36,3
Agua de diálisis	27,9	5,58	21,8	10,9
Pérdida por evaporación	397,3	79,46	155,6	77,8
Conc membrana 15 000 Da	53,6	10,72	74,4	37,2
Agua de diálisis	34,2	6,84	24,1	12,05
Pérdida por evaporación	412,2	82,4	151,5	75,75
Conc. Amicón (10 000 Da)	124,2	24,84	37,8	18,9
Agua de diálisis	5,82	1,16	5,8	2,9
Pérdida por evaporación	369,98	73,99	156,4	78,2

En la composición por tamaño de las moléculas de hemo, para los dializados a pH 4,4 y 5,0; se observó que a pH 4,4 se obtuvo el mayor valor (82 %) de moléculas menores de 1 000 Da lo que indica una mejor hidrólisis a este pH y un mayor número de moléculas, que se encuentran más cerca de la forma monomérica del hemo (616 Da) que a pH 5,0. También se muestra el resto de la composición de cada disolución de acuerdo a la porosidad de las membranas utilizadas oscila entre 3 a 11 % para pH 4.4 y entre 4-37% para pH 5.0

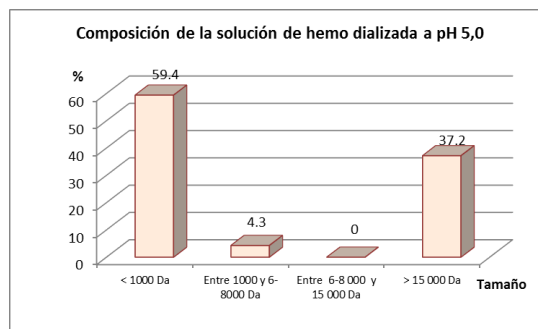
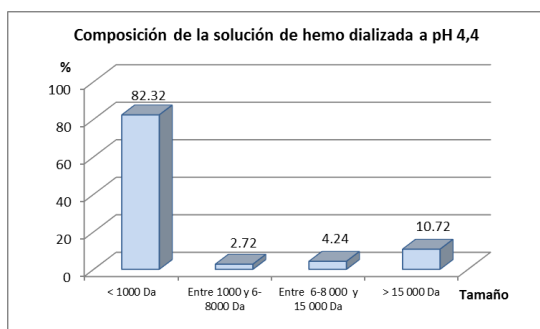


Fig. 1 y 2. Composición por tamaño de las moléculas de la disolución de hemo a pH 4,4 y pH 5,0 en los dializados.

Se considera que las moléculas que aparecen por encima de 15 000 Da se corresponden con los agregados que forma el grupo hemo cuando se encuentran en forma monomérica (tendencia reportada frecuentemente en la literatura),²² debido a que en esta disolución no existen otros componentes que puedan formar estructuras de gran tamaño, puesto que la disolución de hemo semi - purificada, fue sometida a varios procesos de precipitación de proteínas por acidificación, tratamiento con calor y separación por columna.

En el método de separación por centrifugación con tubos Amicon (Figuras 3 y 4) no se observan diferencias apreciables en los valores obtenidos a pH 4,4 y 5,0 en la obtención de moléculas menores de 10 000 Da, lo que indica, que el proceso de centrifugación ayuda conjuntamente con el proceso de hidrólisis por acidificación, a que un determinado número de moléculas de hemo pierda algunos péptidos de mayor tamaño; facilitando que pasen a través de dicha membrana.

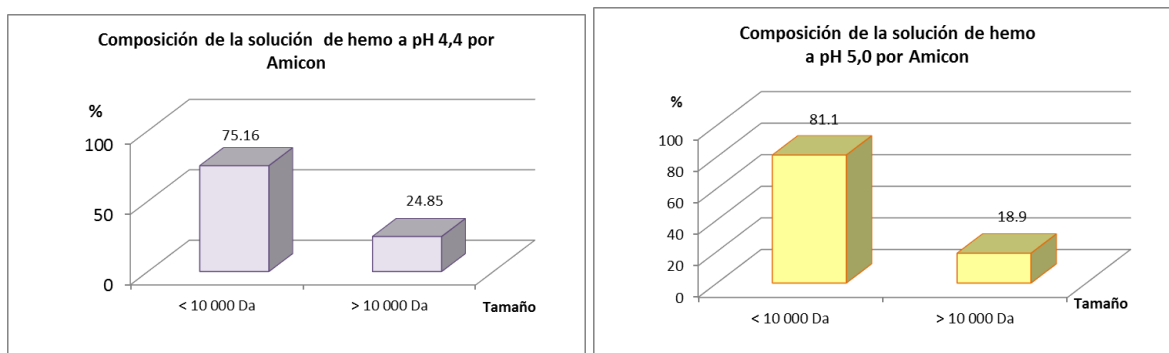


Fig. 3. y 4. Composición por tamaño de las moléculas de la disolución de Hemo a pH 4,4 y pH 5,0 en la separación por centrifugación con membrana de 10 000 Da (Amicón).

En cuanto a los resultados por EM (Fig. 5) se hizo una primera corrida para detectar todos los posibles picos de las muestras a pH- 4,4 y su ubicación en el rango desde 0 hasta 70 000 Da donde queda incluido el peso molecular de la Hb (64 000 Da)

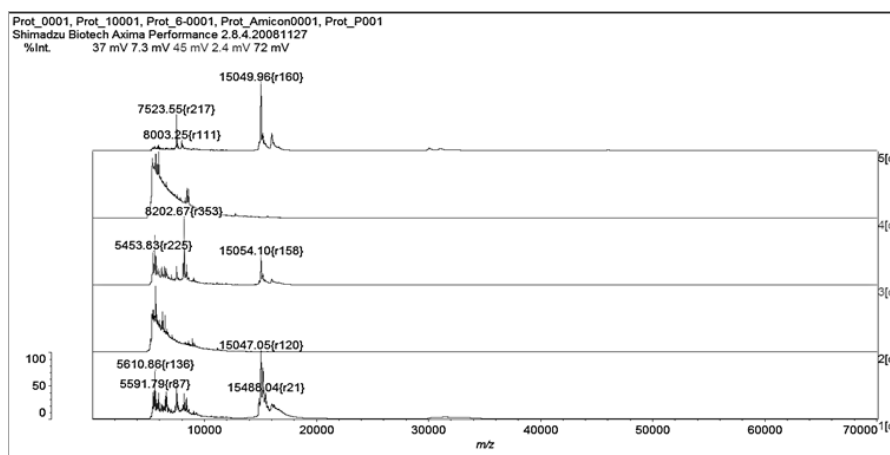


Fig. 5. Espectro de masa barrido en el rango de 0 - 70 000 Da.

Se estudió un rango de peso molecular más estrecho entre 0 y 12 000 Da apreciándose, el pico de hemo 616 Da y los picos de agregados de cada una de las muestras a ambos pH (Figuras 6 y 7). También se examinó por EM²³⁻²⁵ la disolución purificada por columna previa a la diálisis presentando numerosos picos, los cuales desaparecen en su mayoría, después del proceso de dializado.

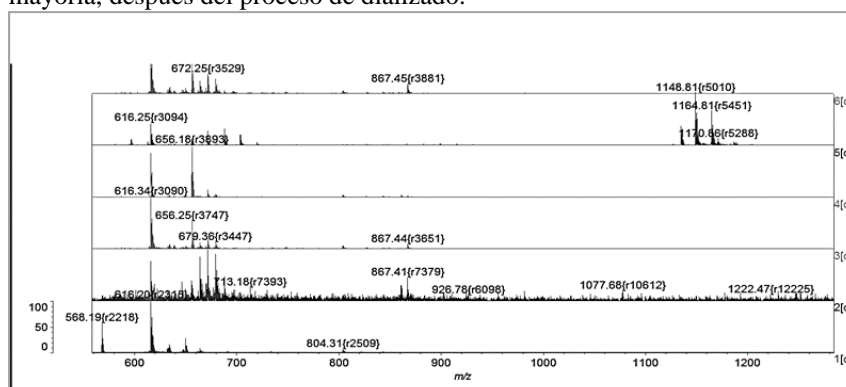


Fig. 6. Espectro de masa del hemo a pH-4,4 en el rango de 0 - 12 000 Da

Como patrón se utilizó la Hematina porcina (633,49 Da) presentando un pico menor de 600 Da que se supone sea un contaminante de interés que no aparece en ninguna de las muestras estudiadas.

problemas de mala absorción o de intolerancia a los preparados a base de hierro iónico por las reacciones adversas que los mismos provocan ⁸⁻⁹.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una disolución de hemo semi- purificada con la utilización de una combinación de métodos que permitió alcanzar un 82 % de hemo asociado a péptidos, menores de 1 000 Da, lo que demuestra el grado de pureza alcanzado. Con la EM se pudieron caracterizar las fracciones obtenidas de cada una de las variantes utilizadas y determinar los picos de agregados y los específicos para grupo hemo, así como la presencia de proteínas de bajo peso molecular en un rango superior a los 5 000 Da lo que nos permitirá en trabajos posteriores la eliminación de los mismos con relativa facilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Awgla (Anemia Working Group Latin America). Compendio de guías latinoamericanas para el manejo de la anemia ferropénica. Editorial Farmaproyectos Ltda 2da Edic. 2007; p.336.
2. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Lozano R, Eisele TP, Brooker SJ, Naghavi M et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014; 123 (5): 615 - 24.
3. Sant – Rayn Pasricha. Anemia: a comprehensive global estimate. *Blood* 2014; 123: p.611-612.
4. Forrellat MB Fernández ND. Anemia de los procesos crónicos. Aspectos clínicos y de laboratorio. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 2002; 18:(3). [Consultado: 10 de diciembre de 2012.] Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892002000300001.
5. Vaquero MP. et al. Genética, Nutrición y Enfermedad.2008. Editado por EDIMSA. Editores Médicos SA. Madrid. [Consultado 13 de octubre de 2015] Disponible en: http://www.naos.aesan.mssi.gob.es/naos/ficheros/investigacion/Genetica_nutricion_y_enfermedad.pdf.
6. Forrelat M, Fernández N Hernández P. Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. [Consultado: 11 de Mayo 2011]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol21_3_05/.
7. Gaitan CD, Olivares MO, Pizarro FA. Biodisponibilidad de hierro en humanos *Revista Chilena de Nutrición*. 2006 Vol.33; No.2.
8. Scott B. Silverstein and George M. Rodgers. Parenteral iron therapy options. *American Journal of Hematology.*, 2004; May 76,Issue1: 74-78. Article first published on line: 22 APR 2004. DOI: 10.1002/ajh.20056.
9. Aurebach M and Ballard H. Clinical use of intravenous iron: Administration Efficacy and Safety. *Hematology ASH*. 2010;(1): 338.
10. Tenhunen Y COL., 1987. Tenhunen R, Tokola O & Linden IB. Haem arginate: a new stable haem compound. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.1987; 39: 780-786.
11. SIEGERT SW, HOLT RJ. Physicochemical properties, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of intravenous hematin: a literature review. *AdvTher*.2008; Sep, 25(9): 842-57. doi: 10.1007/s12325-008-0094-y.
12. Khalafallan AA, Dennis AE. Iron deficiency anemia in pregnancy and Postpartum: Pathophysiology and effect of oral versus intravenous iron therapy. *J.Pregn* 2012; [Consultado: Febrero 1ro, 2013]. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jp/2012/630519/>
13. Hiromi S., Shinji T. and Hiroaki Y. Purification of concentrated haemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expression and Purification*. 1993; (4): 563-569.
14. Andrade CT, Barros Lam, Lima MCP, Azero EG. Purification and characterization of human haemoglobin effect of the haemolysis conditions. *Int. J. of Biological Molecules*. 2004; 34: 233-240.
15. M, Collados. Universidad de Navarra. Manual de prácticas de Laboratorio: Purificación de eritrocitos de ternera.2005. [Consultada 18 de octubre de 2010]. Disponible en: mjcollados@UNAV.es. España.
16. ICSH. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood. (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation. 4ta Ed. *J Cli Pathol*.1996; 49: 271-274.
17. Piñeiro Pauwels, MB .Estudios bioquímicos y genéticos en pacientes diagnosticados con porfiria congénita eritropoyética. Tesis Universidad de Belgrano , 2010. Consultado: 10 de Diciembre de 2013. Disponible en: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/418Pineiro.pdf>.
18. AOAC. Official methods of analysis (Absorción atómica). 13 ed. Horowitz; Washington DC. Association of Official Analytical Chemist. 1980; p. 212.
19. Ray Bakhtiar and Randall W. Nelson. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59: 891-905.
20. Guadix A y Col. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars.Pharmaceutica*. 2000; 41 (1). p: 79-89.
21. García C,H Y Vazquez D, R. Cuantificación de Proteínas: una revision. Instituto de Biotecnología UNAM. Disponible en: www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/bitacora.pdf. Mexico.

22. R. Stiebler, et. al. Increase in the initial soluble heme levels in acidic conditions is an important mechanism for spontaneous heme crystallization in vitro. PLOS ONE. Article first published on line 13 Sept, 2010. DOI: 10.371/journal.pone.0012694.
23. Hyo-Jik Yang, et. al. Characterization of heme ions using MALDI-TOF MS and MALDI FT-ICR MS. International Journal of Mass Spectrometry Volumes 343–344, 1 June 2013, Pages 37–44.
24. Brian L. Boys, Lars Konermann. Folding and Assembly of Hemoglobin Monitored by Electrospray Mass Spectrometry Using an On-line Dialysis System. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Volume 18, Issue 1, January 2007, Pages 8-16.
25. Fei He, Christopher L. Hendrickson, Alan G. Marshall. Unequivocal determination of metal atom oxidation state in naked heme proteins: Fe(III)myoglobin, Fe(III)cytochrome c, Fe(III)cytochrome b5, and Fe(III)cytochrome b5 L47R. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Volume 11, Issue 2, February 2000, Pages 120-126.
26. Jeffrey K. Actor, Ph.D. Immunogens and Antigens. The University of Texas. Medical School. Consultado: 8 Septiembre 2015. Disponible en: <http://www.uth.tmc.edu/pathology/medic/immunology/Immuno/4-ImmunogensandAntigens.pdf>.
27. Diego Gaitán C. y col. Biodisponibilidad del hierro en humanos. Revista Chilena de Nutrición 2006, 33 (2) pag.1-12.