

# **OLIGOSACARINAS (OLIGOSACÁRIDOS)**

Producción química  
y aplicación a los  
cultivos vegetales



VÍCTOR BAUTISTA DÍAZ









# **OLIGOSACARINAS (OLIGOSACÁRIDOS)**

Producción química  
y aplicación a los cultivos vegetales



VÍCTOR BAUTISTA DÍAZ

# **OLIGOSACARINAS (OLIGOSACÁRIDOS)**

Producción química  
y aplicación  
a los cultivos vegetales



EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA

Díaz, Víctor Bautista

Oligosacarinas (oligosacáridos) : producción química y aplicación a los cultivos vegetales / Víctor Bautista Díaz. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Autores de Argentina, 2018.

300 p. ; 15 x 21 cm.

ISBN 978-987-761-465-7

1. Agronomía. 2. Aspectos Técnicos. I. Título.

CDD 631

EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA

[www.autoresdeargentina.com](http://www.autoresdeargentina.com)

Mail: [info@autoresdeargentina.com](mailto:info@autoresdeargentina.com)

Diseño de portada: Justo Echeverría

Queda hecho el depósito que establece la LEY 11.723

Impreso en Argentina – *Printed in Argentina*

*A Eliana, Lara y Marcos*

*En recuerdo de mis primeros juegos,  
que originaron todo.*

*Dedicado a la memoria  
del Dr. Raúl A. Porta (†), maestro infatigable.*



# Índice

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>ACERCA DEL AUTOR .....</b> | <b>15</b> |
| <b>PRÓLOGO.....</b>           | <b>17</b> |

## **CAPÍTULO 1**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>DEFINICIÓN Y GENERALIDADES.....</b>                                     | <b>21</b> |
| 1.1 Hormonas vegetales .....                                               | 23        |
| 1.2 Oligosacarinas: definición y clasificación .....                       | 26        |
| 1.2.1 Oligosacáridos de pectina (oligopectatos, oligogalacturónidos):..... | 27        |
| 1.2.2 Oligosacáridos de xiloglucanos: .....                                | 27        |
| 1.2.3 Oligosacáridos de $\beta$ -glucanos: .....                           | 28        |
| 1.2.4 Quito oligosacarinas: .....                                          | 28        |
| 1.2.5 Oligosacarinas derivadas del alginato: .....                         | 28        |
| 1.2.6 Fructo-oligosacarinas (fructo-oligosacáridos): .....                 | 29        |
| 1.3 Generalidades sobre los métodos de obtención.....                      | 29        |
| Referencias bibliográficas .....                                           | 33        |

## **CAPÍTULO 2**

### **OLIGOSACÁRIDOS DE PECTINA Y DE XILOGLUCANOS:**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>PRODUCCIÓN QUÍMICA .....</b>                                            | <b>37</b> |
| 2.1 Oligosacáridos de pectina (oligopectatos, oligogalacturónidos).....    | 39        |
| 2.1.1 Métodos de producción de OGP.....                                    | 41        |
| 2.1.1.1 Métodos enzimáticos .....                                          | 41        |
| 2.1.1.2 Métodos de hidrólisis ácida.....                                   | 46        |
| 2.1.1.3 Métodos radiolíticos .....                                         | 49        |
| 2.1.1.4 Depolimerización óxido-reductiva (Procesos Fenton).....            | 51        |
| 2.2 Oligosacáridos de xiloglucanos (xiloglucano oligosacáridos, XGO) ..... | 53        |

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1 Métodos de producción de XGO.....                                   | 53 |
| 2.2.1.1 Hidrólisis enzimática de xiloglucanos .....                       | 54 |
| 2.2.1.2 Revisión de otros métodos de obtención teóricamente posibles..... | 57 |
| Referencias bibliográficas .....                                          | 59 |

## **CAPÍTULO 3**

### **OLIGOSACÁRIDOS DE $\beta$ -GLUCANOS Y**

#### **QUITOOLIGOSCARINAS PRODUCCIÓN QUÍMICA..... 67**

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1 Oligosacáridos de $\beta$ -glucanos .....                         | 69  |
| 3.1.1 Residuos de levaduras como materia prima .....                  | 69  |
| 3.1.2 Consideraciones sobre el grano agotado de cervecería .....      | 79  |
| 3.1.3 Oligosacarinas glucánicas derivadas de otras fuentes .....      | 81  |
| 3.2 Quitoologosacarinas .....                                         | 82  |
| 3.2.1 Métodos de producción .....                                     | 83  |
| 3.2.1.1 Depolimerización con ácido nitroso.....                       | 83  |
| 3.2.1.2 Depolimerización de quitosano en medio ácido.....             | 93  |
| 3.2.1.3 Hidrólisis enzimática del quitosano .....                     | 95  |
| 3.2.1.4 Depolimerización oxido-reductiva del quitosano.....           | 96  |
| 3.2.1.5 Depolimerización del quitosano por irradiación $\gamma$ ..... | 102 |
| Referencias bibliográficas .....                                      | 110 |

## **CAPÍTULO 4**

### **OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS DE ALGINATOS**

#### **Y FRUCTOPOLISACÁRIDOS:**

#### **PRODUCCIÓN QUÍMICA..... 125**

|                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1 Oligosacáridos derivados de alginatos.....                            | 127 |
| 4.1.1 Depolimerización radiolítica de alginatos .....                     | 130 |
| 4.1.2 Depolimerización óxido-reductiva (reacción Fenton) .....            | 133 |
| 4.1.2.1 Decoloración (blanqueo) del oligosacárido “crudo” de reacción.... | 136 |



|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.2.1.1 Blanqueo químico.....                           | 137 |
| 4.1.3 Depolimerización enzimática de alginatos.....       | 147 |
| 4.1.4 Hidrólisis ácida de alginatos .....                 | 148 |
| 4.1.5 Hidrotermólisis de alginatos .....                  | 149 |
| 4.2 Fructooligosacáridos; fructooligosacarinas (FOS)..... | 151 |
| 4.2.1 Hidrólisis ácida de polifruktanos.....              | 153 |
| 4.2.2 Otros métodos de degradación de polifruktanos ..... | 154 |
| Referencias bibliográficas.....                           | 156 |

## **CAPÍTULO 5**

### **MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROL..... 169**

|                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1 Introducción .....                                                                                          | 171 |
| 5.1.1 Protocolo propuesto para el desarrollo, control analítico<br>y producción química de oligosacarinas ..... | 172 |
| 5.2 Oligosacáridos de pectica y de xiloglucanos:<br>métodos analíticos de control.....                          | 176 |
| 5.3 Glucano-oligosacáridos y quito-oligosacáridos:<br>métodos analíticos de control.....                        | 178 |
| 5.4 Algino oligosacáridos (ALOS); fructooligosacáridos (FOS):<br>métodos de control .....                       | 180 |
| 5.5 Métodos analíticos complementarios.....                                                                     | 180 |
| Referencias bibliográficas.....                                                                                 | 184 |

## **CAPÍTULO 6**

### **OTROS PROMOTORES Y COADYUVANTES**

### **DEL CRECIMIENTO VEGETAL..... 189**

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| 6.1 Introducción .....                  | 191 |
| 6.2 Triacontanol.....                   | 192 |
| 6.2.1 Producción de n-triacontanol..... | 195 |

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2.1.1 Obtención a partir de residuos<br>de la elaboración de azúcar de caña.....         | 195 |
| 6.2.1.2 Producción a partir de cera de cáscara de arroz.....                               | 204 |
| 6.2.1.3 Producción a partir de residuos de la industrialización del té .....               | 206 |
| 6.3 Residuos de café (SCG).....                                                            | 208 |
| 6.3.1 SCG como materia prima de fertilizantes y enmiendas.....                             | 214 |
| 6.4 Melazas.....                                                                           | 216 |
| 6.5 Vinazas .....                                                                          | 218 |
| 6.5.1 Consideraciones sobre los procesos de<br>concentración de vinazas de alcoholera..... | 225 |
| 6.5.1.1 Concentración por evaporación.....                                                 | 226 |
| 6.5.1.2 Concentración a través de métodos de UF, NF, RO.....                               | 227 |
| Referencias bibliográficas.....                                                            | 234 |

## **CAPÍTULO 7**

### **APLICACIÓN DE OLIGOSACARINAS**

#### **A LOS CULTIVOS TROPICALES..... 255**

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| 7.1 Introducción .....          | 257 |
| 7.2 Café .....                  | 258 |
| 7.3 Cacao .....                 | 260 |
| 7.4 Caña de azúcar.....         | 262 |
| 7.5 Ananá .....                 | 264 |
| 7.6 Banano.....                 | 267 |
| Referencias bibliográficas..... | 270 |

#### **APÉNDICE ..... 278**

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Aplicación de oligosacarinas a los cultivos<br>frutícolas, hortícolas y ornamentales ..... | 278 |
| Referencias bibliográficas.....                                                            | 280 |

## TABLA DE ILUSTRACIONES

|                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 2.1: Producción de OGP por hidrólisis enzimática:<br>método tentativo.....                                            | 41  |
| Figura 2.2: Producción de OGP por hidrólisis clorhídrica<br>y/o hidrotérmica de la pectina de citrus.....                    | 45  |
| Figura 3.1: Producción de extracto de levadura<br>para alimentación y cosmética: método tentativo.....                       | 73  |
| Figura 3.2: Producción de oligosacarinas<br>de beta-glucanos de levadura:método tentativo “A” .....                          | 74  |
| Figura 3.3: Producción de oligosacarinas<br>de beta-glucanos de levadura:método tentativo “B” .....                          | 75  |
| Figura 3.4: Depolimerización de quitosano con $\text{HNO}_2$<br>(deaminación) .....                                          | 80  |
| Figura 3.5: Reacción del $\text{NaBH}_4$ sobre carbohidratos reductores<br>y formación del éster bórico correspondiente..... | 82  |
| Figura 3.6 Producción de quitoooligosacarinas<br>por depolimerización con $\text{HNO}_2$ : método tentativo .....            | 85  |
| Figura 3.7 Reacción de Fenton y contribución de Haber-Wilstätter ..                                                          | 93  |
| Figura 3.8: Depolimerización de quitosano<br>vía Fenton: orden de reacción.....                                              | 95  |
| Figura 3.9: Radiólisis del agua pura .....                                                                                   | 98  |
| Figura 3.10 Producción de quitoooligosacarinas<br>por depolimerización con radiación $\gamma$ : método tentativo .....       | 104 |
| Figura 4.1: Evolución del peso molecular medio del alginato<br>en función de la dosis de radiación $\gamma$ .....            | 128 |
| Figura 4.2: Producción de algin-oligosacarinas (ALOS)<br>por depolimerización vía procesos Fenton: método tentativo I.....   | 137 |
| Figura 4.3 Producción de ALOS vía Fenton:<br>método tentativo II .....                                                       | 142 |
| Figura 6.1: Triacantanol: método                                                                                             |     |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| de producción tentativo (cachaza) (I).....                           | 198 |
| Figura 6.2 Triacantanol: método                                      |     |
| de producción tentativo (cachaza) (II) .....                         | 199 |
| Figura 6.3 Triacantanol: método                                      |     |
| de producción tentativo (arroz) .....                                | 201 |
| Figura 6.4: Triacantanol: método de producción tentativo             |     |
| (residuos de la industrialización del té) .....                      | 204 |
| Figura 6.5: Vinazas: método de producción tentativo de fertilizantes |     |
| por tecnologías de UF-NF-RO/ resinas de adsorción .....              | 229 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 5.1: OGP y XGO: métodos analíticos de control ..... | 174 |
| Tabla 5.2: GOS y QOS: métodos analíticos de control.....  | 175 |
| Tabla 5.3 ALOS y FOS: métodos analíticos de control.....  | 176 |

## ACERCA DEL AUTOR

Víctor B. Díaz es argentino, Licenciado en Química (1978) y Técnico Químico (1967). Su actividad profesional se resume en 45 años de experiencia en la industria químico-farmacéutica, 42 de los cuales exclusivamente dedicados en laboratorios industriales de desarrollo e investigaciones químicas (ha ocupado la Gerencia de I+D durante 26 años en la industria bioquímico-farmacéutica).

Sus campos de trabajo incluyen Heparinas, polisacáridos sulfatados y sus modificaciones semisintéticas, Drogas Complejas (Heparinas de bajo peso molecular y complejos nanoparticulados Hierro-Carbohidratos), valorización de desechos proteicos, fertilizantes de base aminoacídica y promotores de crecimiento vegetal.

Es autor de 26 patentes sobre polisacáridos de interés farmacéutico, (incluyendo métodos “*de novo*” aplicados a la producción de heparinas de bajo peso molecular) y de complejos coloidales hierro-carbohidratos.

Recibió el Premio Fundación Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires) (1989) y es autor de cinco publicaciones científicas con referato, un capítulo en “Polymeric Materials Encyclopedia” y tres libros sobre los temas citados.



## PRÓLOGO

Los aspectos generales relacionados con las hormonas vegetales y los promotores de crecimiento de las plantas constituyen campos de investigación activa dentro de la Bioquímica y la Fisiología Vegetal, como así también sus aplicaciones a la Agricultura.

En particular, el caso de las oligosacarinas (en rigor, oligosacáridos) no constituye una excepción, respecto de las cuales se registra una intensa actividad de investigación.

Por cierto, se encuentran disponibles excelentes y actualizados libros sobre los avances en investigación sobre oligosacarinas (véase, por ejemplo, “Research Progress in Oligosaccharins”, Yin, H., Du, Y. eds; 2016, Springer-Verlag, NY). Sin embargo, la revisión de bibliografía básica de textos que se ocupen de la producción químico-industrial de las oligosacarinas (y aún de otros promotores de crecimiento vegetal), revela que existe un vacío sustancial al respecto.

Esta contribución aspira a compensar esta falta de libros técnicos sobre este apasionante campo: la producción químico-industrial de oligosacarinas. En el presente texto se revisarán también los aspectos tecnológicos de otros promotores de crecimiento no necesariamente sacarídicos, también poco relevados en la literatura fundamental.

En tanto sea posible, se revisarán fuentes alternativas de obtención de oligosacarinas, poniendo especial énfasis en la valorización de desechos agrícolas utilizados para tal fin.

El autor piensa que esta obra puede ser interesante para estudiantes y graduados de las carreras de Bioquímica Técnica, Química y Agronomía, así como para todo profesional que se

enfrente al desarrollo de métodos tecnológicos de obtención de oligosacarinas y compuestos de actividad biológica relacionada.

- El autor desea declarar los siguientes puntos, a saber:
- El presente texto fue redactado desde su actual situación de retiro, sin lazos comerciales o industriales de ningún tipo.
- Cuando se citan patentes de invención, no se hace con objeto de estimular su copia o violar cualquier derecho patentario, sino que se revisa esta bibliografía dada la extensa información científica y tecnológica de las que son depositarias. La consulta habitual de la bibliografía de patentes es una práctica muy poco difundida en los países en estado de desarrollo.
- En ningún lugar del presente texto se comenta o se difunde información propietaria o de carácter reservado. Todo lo afirmado y graficado se hace en base a bibliografía previamente publicada, tal como se la encuentra referenciada al final de cada capítulo y en los pies de gráficos.
- Cuando se citan marcas registradas o productos comerciales, se hacen a título de divulgar información técnica, sin que ello signifique una inducción a su uso con preferencia a otras marcas registradas no citadas.

El autor espera que este texto resulte útil y que contribuya a completar el citado vacío bibliográfico, y agradece a su querida esposa Eliana por su constante apoyo y comprensión, así como su ayuda en la preparación de gráficos y revisión final del texto.

El agradecimiento es extensivo a Ana María Paonessa por el tipeo y corrección de los manuscritos.



Por este medio el presente autor eleva su recuerdo y agradecimiento al Dr. E.Emmet Reid (1872-1973), cuyo libro “Invitación a la Investigación Química” (EUDEBA; II Edición, 1977) ha sido permanente fuente de guía e inspiración a lo largo de todas las etapas de su vida, incluso en la hora actual, como Químico retirado.

*Víctor B. Díaz*



## **CAPÍTULO 1**

# **DEFINICIÓN Y GENERALIDADES**



## 1.1 Hormonas vegetales

Se ha definido a las hormonas como sustancias químicas producidas por animales y vegetales en cantidades minúsculas, capaces de transportarse de una parte a otra del organismo vivo, en donde generan respuestas sobre la fisiología y el crecimiento. En las plantas, las hormonas no son producidas en tejidos especializados, sino en aquellos que, a la vez, llevan a cabo otro tipo de funciones (1). Se han definido como clases mayoritarias de hormonas vegetales, a saber:

- Auxina
- Citokininas
- Gibberelinas
- Brassinosteroides
- Ácido abscísico
- Etileno
- Jasmonatos
- Oligosacarinas

La auxina (ácido indolacético) promueve la elongación y crecimiento de los brotes, la formación de raíces adventicias y facilita la producción de etileno. En forma conjunta con las citokininas, promueven la división celular (1).

Las citokininas regulan el crecimiento del vegetal, la mo-

vilización de nutrientes, la diferenciación vascular y la promoción del crecimiento de los cloroplastos (1).

Las gibberelinas promueven la elongación de los brotes y varias funciones vinculadas a la producción de enzimas (1).

Los brassinosteroides (polihidroxiesteroides) son de amplia difusión en los vegetales y tienen alta concentración en el polen (2). Despliegan varias funciones, tales como la estimulación del crecimiento de la planta, favorecen el gravitropismo y generan resistencia frente al stress vegetal (2).

El ácido abscísico actúa como mediador en la respuesta frente a varios tipos de stress, incluido el stress debido a elevada salinidad (3).

El etileno promueve la maduración de frutos y despliega un importante rol desde el punto de vista ecológico, ya que su producción se acentúa frente a determinados factores que generan varios tipos de stress vegetal (exposición a productos químicos tóxicos, temperaturas extremas, ataques de patógenos, etc.) (1).

Los jasmonatos (derivados ciclopentanónicos del ácido linoleico) son importantes reguladores celulares que participan en diferentes procesos, tales como la germinación de semillas, el crecimiento radicular, la fertilidad y la maduración de los frutos (2) (3).

Las oligosacarinas son oligosacáridos (generalmente complejos) capaces de modular el crecimiento vegetal y actuar como reguladores de la respuesta de la planta frente al ataque de fitopatógenos, los cuales activan la generación de determinadas oligosacarinas por lisis enzimática de la pared celular del vegetal atacado. Estos oligosacáridos particulares influyen en el crecimiento de las raíces y de la floración y su

bioquímica las hace moléculas susceptibles de interesantes y difíciles estudios (1) (2).

El ácido salicílico de formación endógena también es considerado como una fitohormona por participar en los procesos de la fotosíntesis, el metabolismo de los nitratos, la producción de etileno, la respuesta frente al stress por exceso de salinidad y los mecanismos de la floración (3).

Si bien las hormonas vegetales son productos naturales, se han sintetizado químicamente multiplicidad de moléculas que desarrollan acción hormonal. Sin embargo, en estos casos, a estas moléculas de síntesis no se las denomina fitohormonas, sino reguladores del crecimiento vegetal (3). Tal es el caso de ciertos compuestos triazólicos desarrollados a tal fin (3).

Sin embargo, también es verdad que desde el punto de vista químico industrial, comúnmente se denomina hormona vegetal a toda sustancia natural o sintética que desarrolla tal actividad. Tal es el caso del ácido indolbutírico obtenido por síntesis química, el polietilenglicol, proteínas y aminoácidos, dinoseb (2 sec butil 4-6 dinitrofenol), etc. (4), sin olvidar el primer herbicida altamente activo producido por síntesis orgánica, denominado 2,4 D, el cual fue la piedra fundamental de la industria de herbicidas, obtenido por procesos sintéticos (5).

En lo relativo a las actividades biológicas de las hormonas vegetales, están disponibles en la literatura científica excelentes revisiones históricas; para el caso de brassinoesteroides y jasmonatos, véase (2); sobre la descripción de cloroauxinas naturales, véase (6); la literatura sobre oligosacarinas se irá revisando correspondientemente a lo largo del desarrollo del presente texto.

## 1.2 Oligosacarinas: definición y clasificación

Citando específicamente a Falcón Rodríguez y colaboradores (7), “los componentes polisacáridos y glicoproteicos de las paredes celulares constituyen una fuente de oligosacáridos, que además de ser elicitores de respuestas defensivas de la planta, algunos ejercen efectos en el crecimiento y desarrollo de la misma a bajas concentraciones. El término oligosacarinas se refiere por tanto a oligosacáridos de diferente origen con efectos biológicos en las plantas”. Esta definición es clara, sencilla y suficientemente extensa para los fines de este libro, pero se pueden encontrar otras definiciones (conceptualmente no diferentes) en la bibliografía referenciada.

Las oligosacarinas despliegan una actividad biológica específica según el tipo de especie vegetal y su propia estructura química, fundamentalmente el grado de depolimerización del oligosacárido, al cual está vinculado su peso molecular promedio.

Estos oligómeros bioactivos pueden ser derivados de la pared celular de hongos (tal como los oligosacáridos de glucanos y de quitina/quitosano), o bien de la pared celular de plantas, tales como los derivados de xiloglucanos y de pectinas (8). No obstante, veremos que este ordenamiento, indudablemente académico, se amplía permanentemente con la aparición de nuevas oligosacarinas descubiertas a través de intensivos trabajos de investigación. También se verá que las fuentes industriales de preparación de las oligosacarinas no siempre se derivan de las señaladas en esta clasificación: oligosacarinas derivadas de quitina/quitosano, no se obtienen



de la quitina presente en hongos, sino partiendo de descartes de industrialización de recursos marinos.

La clasificación propuesta a continuación pretende conceptualizar las diferentes clases de oligosacarinas de relevancia industrial, muchas de ellas obtenidas a escala técnica, a saber:

### **1.2.1 Oligosacáridos de pectina (oligopectatos, oligogalacturónidos):**

Constituidos por cadenas lineales de moléculas de ácido galacturónico unidas entre sí por enlaces  $\alpha$  1-4. Su fuente de obtención industrial es la pectina de cítricos (Pectimorf®) (7) (8) (9) (10).

### **1.2.2 Oligosacáridos de xiloglucanos:**

Derivados de la pared celular de plantas, son oligosacáridos hemicelulósicos. Los xiloglucanos son constituyentes de la pared celular de vegetales, formados por la unión de moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4, en donde algunos restos de glucosa son reemplazados por  $\alpha$ -xilosa,  $\beta$ -galactosa y  $\alpha$ -fucosa en las cadenas laterales, y también por  $\alpha$ -L-arabinosa (7) (10).

No obstante, su estructura es mucho más compleja que lo expuesto. La fucosa es fundamental para la actividad biológica, pero admite ser reemplazada por  $\alpha$ -L-galactosa (9). La fuente comercial de obtención son algunos tipos de semillas (tales como las de tamarindo) y la madera de arce (10). Polisacáridos relacionados con los xiloglucanos también han demostrado tener actividad biológica: tal es el caso de los xilanos, galactoglucomananos, galactoglucoromananos e incluso celulosa (9).

### **1.2.3 Oligosacáridos de $\beta$ -glucanos:**

Derivados de la fragmentación de  $\beta$ -glucanos contenidos en la pared celular de hongos (*Phytophthora sojae*; *Shitake*, etc.), están constituidos por cadenas de 3, 6 y 3-6  $\beta$  glucósidos (10); también están contenidos en algas marrones, tales como la laminaria (base del producto comercial Iodus 40<sup>®</sup>, Vacciplant (7), pero también están presentes en la levadura de cerveza y, en menor proporción, en los salvados de avena y cebada (11).

### **1.2.4 Quitooligosacarinas:**

Fragmentos de quitina y/o quitosano, polisacáridos presentes en la pared celular de hongos, aunque la materia prima para su producción industrial son las caparazones de crustáceos marinos (fundamentalmente cangrejos). En efecto, la materia de partida (quitina) tiene versátiles aplicaciones para la obtención de multiplicidad de derivados (fundamentalmente glucosamina y quitosano) y se produce a escala mundial a partir de crustáceos, como subproducto de la industria pesquera; la misma se obtiene en cantidades de 10.000 toneladas por año, por lo que su valorización significa fuerte impacto positivo sobre el medio ambiente (7).

### **1.2.5 Oligosacarinas derivadas del alginato:**

Obtenidas por degradación del ácido algínico, presente en las algas marrones y constituido por cadenas de ácido gulturónico y ácido manurónico (12); el ácido algínico, por tanto, es un polímero polianiónico y sus oligosacáridos tendrán también este carácter.

### 1.2.6 Fructo-oligosacarinas (fructo-oligosacáridos):

Los fructooligosacáridos son oligosacáridos de fructosa (también llamada “levulosa”), que contienen una única unidad de glucosa a la que los restos de fructosa están unidos a la posición  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) de una molécula de sacarosa (13): si Gl representa una molécula de glucosa y  $F_r$  una de fructosa, la fórmula molecular de los fructooligosacáridos puede ser simbolizada según  $GlFr_n$ , en donde n representa el número de unidades de fructosa (13).

Así, la kestosa será  $GlFr_2$ , nistosa  $GlFr_3$  y la fructofuranosilnistosa  $GlFr_4$ .

Los fructooligosacáridos presentan una interesante gama de aplicaciones en la industria de alimentos como prebióticos, y sus métodos de obtención reposan fundamentalmente en los procesos de biosíntesis o biotecnológicos. Estos oligómeros de fructosa (oligofructosa, oligofructanos) han sido recientemente introducidos y empleados como hormonas vegetales, dado su interesante actividad como reguladores del crecimiento vegetal (14).

## 1.3 Generalidades sobre los métodos de obtención

Los métodos de degradación generalmente aplicados sobre los polisacáridos “madre” para obtener las respectivas oligosacarinas son:

- Hidrólisis en medio ácido (menos comúnmente, en medio alcalino). Se incluye la depolimerización con ácido nitroso cuando sea conducente.
- Hidrólisis enzimática a través del uso de enzimas espe-

cíficas, tales como las endoglicanasas, la poligalacturonasa, etc. (9).

- Irradiación  $\gamma$ .
- Empleo de métodos depolimerizantes particulares, generalmente desarrollados para la obtención de otros tipos de carbohidratos poliméricos, tal el caso de la aplicación de reacciones de fragmentación radicalaria. Serán revisados correspondientemente.
- Los procedimientos sintéticos son habitualmente biotecnológicos.

Debe puntualizarse desde el comienzo que los métodos de fraccionamiento ocupan un lugar preponderante en la obtención técnica de oligosacarinas y, en particular, aquellos procesos que permiten aislar la fracción oligosacáridica deseada: dado que la actividad biológica depende (entre otras variables) del grado de polimerización de la oligosacarina en cuestión, los métodos aplicados para el aislamiento de una fracción oligosacáridica poco dispersa deben ser técnicamente eficientes, rápidos y reproducibles con altos rendimientos. Por ejemplo, en el caso de los oligogalacturónidos, la mayor bioactividad se obtiene con cadenas del carbohidrato que contiene 12-13 residuos de ácido galacturónico (9).

Estos mismos autores (9) plantean las dificultades relativas a la obtención de oligosacarinas, esto es:

- Obtención de un oligosacárido particular y, por tanto, estructuralmente caracterizable.
- Desarrollo de ensayos específicos para evaluar su actividad biológica.

Desde un punto de vista industrial, resulta obvio que no

podrá obtenerse un oligosacárido único, esto es, monodisperso, y lo que se prepara habitualmente son oligosacáridos mezcla con un índice de dispersidad adecuado, lo más cercano posible al valor 1 (sobre los aspectos de pesos moleculares, véase (15) ).

Por tanto, las técnicas industriales de fraccionamiento reposarán fundamentalmente en procesos de separación por membranas (ultrafiltración, diafiltración, nanofiltración), por otra parte comunes a todo fraccionamiento industrial de oligo y polisacáridos (16) (17).

En este aspecto, debe destacarse lo siguiente: para la obtención de una oligosacarina particular, con fines de estudio e investigación, indudablemente el procedimiento de elección es el propuesto por Larskaya, I.A. y Gorshkova, T.A. (9).

Sin embargo, resulta claro que la sola inspección del método revela que no puede ser utilizado para la producción de oligosacarinas a escala técnica.

La preparación comercial de estos oligosacáridos reposa fundamentalmente en el criterio de utilizar materiales de partida industrialmente asequibles y baratos y, en particular, productos de desecho de la industria agroalimentaria.

Esto conlleva dos ventajas ineludibles:

- Partir de materia prima abundante y barata, fácilmente asequible.
- Minimizar el impacto ambiental que el volcado de tales desechos supone para el medio ecológico.

De la misma manera, frente a la obtención industrial de oligosacarinas debe tenerse en cuenta que probablemente no sea necesaria su purificación extrema; restos de aminoácidos y polipéptidos, por ejemplo, difícilmente atenten con-

tra su bioactividad, todo lo contrario. Estos aspectos pueden ser importantes cuando se parte de descartes agroindustriales, habitualmente compuestos de carbohidratos y proteínas.

En estos casos, el técnico actuante puede encontrarse al final de la preparación con una mezcla que contiene la fracción poco dispersa de oligosacarinas acompañadas de aminoácidos y polipéptidos, compartiendo con las primeras aproximadamente el mismo peso molecular promedio y el mismo perfil de distribución molecular, mezcla cuya resolución ofrece inconvenientes desde el punto de vista teórico, pero en principio de resolución inútil a los fines técnicos. El profesional operante, asociado al criterio del experto agrónomo, será quien decida sobre la necesidad de ulteriores pasos complejos de purificación de los oligosacáridos obtenidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Raven, P.H.; Johnson, G.B. (2002); "Biology", Part IX: Plant Reproduction. Chapter 41: How plants grow in response to their environment (McGraw Hill, VI ed.): 807- 836. [www.mhhe.com/biosci/genbio/raven6b/other/raven06\\_41.pdf](http://www.mhhe.com/biosci/genbio/raven6b/other/raven06_41.pdf).
- 2) Creelman, R.A.; Mullet, J.E. (1997); "Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: Non-traditional regulators of plant growth, development, and gene expression". *The Plant Cells*, 9: 1211-1223. doi: 10.1105/tpc.9.7.1211. <https://pdfs.semanticscholar.org/b786/160b445de705a311266993c8ed2dd1384940.pdf>
- 3) Ghorbani Javid, M.; Sorooshzadeh, A.; Moradi, F.; Modarres Sanavy, S.A.M.; Allahdadi, I. (2011). "The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants". *Australian J. Crop. Sci.* 5(6): 726-734. [http://cropj.com/javid\\_5\\_6\\_2011\\_726\\_734.pdf](http://cropj.com/javid_5_6_2011_726_734.pdf).
- 4) Harms, Ch.L.; Oplinger, E.S. (1988). "Plant growth regulators: their use in crop production". North Central Region Extension Publication 303. <http://www.extension.umn.edu/agriculture/nutrient-management/non-traditional-amendments/docs/NCREP-303-1.pdf>.
- 5) Morgan, P.W. (1979). "Agricultural uses of plant growth substances: an analysis of present status and future potential". The Department of Plant Science, Texas A&M University, Texas. [http://pgrsa.org/sites/default/files/conference\\_proceedings/pgrsa\\_1979.pdf](http://pgrsa.org/sites/default/files/conference_proceedings/pgrsa_1979.pdf).

- 6) Engvild, K.C. (1994). "The chloroindole auxins of pea, strong plant growth hormones or endogenous herbicides?" Risø-R-705 (EN). Risø National Laboratory, Roskilde, Denmark.  
[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/25/049/25049541.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/25/049/25049541.pdf)
- 7) Falcón Rodríguez, A.B.; Menéndez, D.C.; González-Peña Fundora, D.; Nápoles García, M.C. (2015). "Review - New natural products for agriculture: the oligosaccharins". *Cultivos Tropicales* 36: 111-129.  
[Scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr10s111.pdf](https://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr10s111.pdf)
- 8) Saborio, F. (2011). *Oligosacarinas* (Univ. de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias). <https://franciscosaborio.files.wordpress.com/2011/11/oligosacarinas-word.pdf>
- 9) Larskaya, I.A.; Gorshkova, T.A. (2015). "Plant oligosaccharides – Outsiders among elicitors?" *Biochemistry (Moscow)* 80(7): 1049-1071.  
[http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v80/pdf/bcm\\_0881.pdf](http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v80/pdf/bcm_0881.pdf)
- 10) Enríquez-Guevara, E.A.; Aispuro-Hernández, E.; Vargas-Arispuro, I.; Martínez-Téllez, M.A. (2010). "Oligosacarinas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas". *Rev. Mexicana Fitopatol.* 28(2): 144-155.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000200007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000200007)
- 11) Teas, J. (1983). "The dietary intake of *laminarin*, a brown seaweed and breast cancer prevention". *Nutrition and Cancer* 4(3): 217-222.



- doi: 10.1080/01635588209513760.
- 12) Naeem, M.; Idrees, M.; Aftab, T.; Masroor, M.; Moinuddin, K.; Varshney, L. (2011). "Irradiated sodium alginate improves plant growth, physiological activities and active constituents in *Mentha arvensis* L. J. Appl. Pharm. Sci. 2(5): 28-35. doi: 10.7324/JAPS.2012.2529.  
[http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/457\\_pdf.pdf](http://www.japsonline.com/admin/php/uploads/457_pdf.pdf).
  - 13) Colabone Celligoi, M.A.P.; dos Santos, D.A.; da Silva, P.B.; Baldo, C. (2015). "Biotechnological Applications of fructooligosaccharides in food processing industries" in Fermented Foods – Part I: Biochemistry and Biotechnology": 348-364.  
[file:///D:/Descargas/Fermented%20Foods%20Ch%2019%20\(2\).pdf](file:///D:/Descargas/Fermented%20Foods%20Ch%2019%20(2).pdf).
  - 14) Balar, Ch.; Nakum, A. (2011). "An efficient role of natural compounds fructooligosaccharides, steroidal saponins derived from plant in agriculture field as a plant growth promoter". World Patent Application WO 2011154968 A2.
  - 15) Díaz, V.B. (2017). "Polisacáridos Industriales de Interés Farmacéutico: Aislamiento, Purificación, Fraccionamiento" (AMV Ediciones, Madrid, [www.amv.ediciones.com](http://www.amv.ediciones.com). ISBN 978-84-945166-6-5): 10-20.
  - 16) Díaz, V.B. (2017). op. cit.: 21-59.
  - 17) Díaz V.B. (2016). "Conversión Técnica de Proteínas. Valorización de desechos proteicos" (AMV Ediciones, Madrid, [www.amvediciones.com](http://www.amvediciones.com). ISBN 978-84-945558-3-1): 201-208.



**CAPÍTULO 2**

**OLIGOSACÁRIDOS DE PECTINA  
Y DE XILOGLUCANOS:  
PRODUCCIÓN QUÍMICA**



## **2.1 Oligosacáridos de pectina (oligopectatos, oligogalacturónidos)**

La célula vegetal está rodeada de una pared celular, que la contiene, encerrando el protoplasma y cementándose, a la vez que interactuando con células vecinas, lo cual constituye los diferentes tejidos de las plantas. Esta pared celular está compuesta por una variedad de carbohidratos polisacáridos complejos, entrelazados entre sí y formando una verdadera malla. Estos carbohidratos complejos están constituidos fundamentalmente por las pectinas, la celulosa y las hemicelulosas, entre las cuales no se descarta una vinculación covalente. En principio, y acorde con Izquierdo Oviedo (1), la celulosa y el xiloglucano forman un complejo en donde este último actúa como interconector o entrecruzador de las fibras celulósicas.

Esta estructura se encuentra compenetrada por los polisacáridos pécticos, de manera que el todo se comporta como una superestructura macromolecular, cuya degradación da origen a un sinnúmero de oligosacáridos con definida actividad biológica en los vegetales.

Los polisacáridos pécticos (pectinas) contienen una frac-

ción relativamente homogénea consistente en polímeros del ácido galacturónico. Estos ácidos poligalacturónicos se hallan presentes en la matriz extracelular de los tejidos jóvenes de los frutos y presentan un grado importante de heterogeneidad estructural (2). En efecto, su grado de esterificación es variable, a lo que se suma la existencia de ramificaciones que contienen restos de L-arabinosa, galactosa, fucosa, xilosa y ácido glucurónico (2). Los oligogalacturónidos son oligómeros lineales de ácido D-galacturónico y presentan uniones  $\alpha$  (1-4).

Las pectinas de los frutos cítricos proporcionan una fuente de poligalacturónidos interesantes como materia prima desde el punto de vista industrial, en orden a la obtención de oligogalacturónidos pécticos (en lo que sigue, OGP). Los residuos de la producción de jugo de manzana y de cítricos son efectivamente los indicados para la producción de pectinas a escala industrial: obtenida la pectina se procede a demetilar la misma por vía alcalina o enzimática; los OGP, a su vez, se obtienen por hidrólisis ácida o enzimática del ácido poligalacturónico (3) (citado por Izquierdo Oviedo).

Este paso de demetilación parece obligado, en tanto se ha comprobado que la bioactividad de los OGP disminuye cuando los grupos carboxilo están esterificados o cuando el oligómero se somete a reducción, en cuyo caso el extremo reductor se transforma en el alditol correspondiente (1).

Indudablemente, el grupo de investigadores cubanos pertenecientes al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) han aportado un volumen muy importante de excelentes estudios sobre oligosacarinas y, en particular, sobre los OGP, siendo éstos los oligosacáridos con bioactividad vegetal más estudiados.

Por cierto, la preparación comercial de OGP en forma controlada y de constitución uniforme (Pectimorf®) fue llevada a cabo en el INCA cubano y está constituido por oligosacáridos con grado de polimerización de entre 9-16 moléculas de ácido galacturónico, partiendo de los desechos de la obtención de jugos cítricos (4) (5) (citados por (1)). Pectimorf® es un producto de origen natural constituido por OGP, con un tenor de 58-61% de ácido galacturónico, el cual se expende en forma sólida en frascos que contienen 20 y 60 mg de producto (6).

### **2.1.1 Métodos de producción de OGP**

Los métodos habitualmente practicados para la obtención de OGP pueden clasificarse como sigue:

- Hidrólisis enzimática
- Hidrólisis ácida
- Métodos radiolíticos
- Depolimerización óxido-reductiva (procesos Fenton)

#### **2.1.1.1 Métodos enzimáticos**

El uso de enzimas industriales en la fabricación de jugos de fruta es conocido desde hace décadas y utilizado con excelentes resultados. En particular, se utilizaron preparados pectinolíticos con el objeto de eliminar las pectinas de los jugos, dado que la pectina es la principal responsable de la generación de alta viscosidad en el jugo, impidiendo la correcta floculación de las partículas en suspensión: de hecho, los procesos de clarificación tienen lugar con éxito cuando se ha eliminado totalmente la pectina del jugo (7).

Para el caso que se está tratando, las enzimas pectinolíticas más importantes son (8):

- Poligalacturonasa, la cual produce una hidrólisis azarosa de las pectinas.
- Pectin metil esterases, las cuales hidrolizan los metil ésteres de la pectina con la liberación concomitante de  $\text{CH}_3\text{OH}$  al medio, facilitando la acción de la poligalacturonasa.
- Pectinoliasas: Clivan la pectina en oligómeros, pero no despliegan acción esterásica.

En el momento actual, existen sofisticadas preparaciones enzimáticas con actividad pectin metil esterásica asociada al comportamiento poligalacturonásico (Pectinex® Yieldmash Extra; Novozimes A/S) (9). El preparado enzimático Lallzyme C™ (Lallemand) posee alta actividad poligalacturonásica y pectinoliásica con controlada acción pectinoesterásica (8). Como siempre, los aspectos relacionados con la enzima a utilizar, las condiciones de hidrólisis, la caracterización de pectinas cítricas de diferentes orígenes vegetales y de diferente procedencia comercial, etc., forman parte de las primeras etapas del desarrollo.

En la práctica técnica, el control del avance de la reacción enzimática puede ser efectuado a través de la bien conocida prueba del alcohol (7).

**Reactivo:** Etanol 96° al que se ha añadido ácido clorhídrico en cantidad suficiente para 1% de concentración.

**Operación:** Un volumen de líquido en digestión se mezcla con 1,5-2 vols. de reactivo: si al cabo de 15 minutos no



se presenta precipitado, la pectina ha sido extensamente hidrolizada.

Naturalmente, este seguimiento cinético sencillo, no excluye que a cada instante prefijado de toma de muestra, se practique a la vez sobre una segunda porción la precipitación con alcohol en exceso y la determinación de pesos moleculares y distribución molecular por métodos de HPSEC. Se logrará así “calibrar” con fines técnicos aproximados el ensayo de precipitación alcohólica con el peso molecular instantáneo de la pectina en proceso de digestión. Se debe tener en cuenta que el grado de polimerización de las OGP es la característica estructural más definitoria en lo relativo a la expresión de su actividad agrobiológica, en particular, aquellos OGP de grado de polimerización comprendido entre 9 y 16 residuos urónicos (10).

En la actividad industrial, el uso de enzimas pectin metil esterásicas puede ser reemplazado, poniendo en práctica una cuidadosa hidrólisis alcalina de los metil ésteres luego de una hidrólisis enzimática llevada a cabo con pectinoliasas: el tratamiento de los oligómeros resultantes de la acción de la pectinoliasa son saponificados merced a la reacción con NaOH 0,05 M, 90 minutos a 0°C (11). Pero indudablemente, los trabajos actuales sobre las tecnologías de producción enzimática de OGP se basan en la relevante patente de Kuntz et al (12), quienes no solo introducen la “hidrólisis en cascada” con diferentes enzimas, sino que utilizan métodos ágiles y escalables, de fraccionamiento por ultrafiltración (UF). La asequibilidad de esta importante referencia bibliográfica exime de mayores comentarios: la totalidad de tratamientos enzimáticos y de

hidrólisis en medio ácido se encuentran explicados en este documento patentario.

Los pesos moleculares de los productos de hidrólisis y/o sus fracciones pueden ser evaluados por métodos de cromatografía de intercambio aniónico de alta performance (HPAEC, por sus siglas en inglés) (13) o bien por métodos cromatográficos de exclusión molecular (HPSEC).

Desde el punto de vista técnico, el empleo de enzimas que desplieguen actividad pectin metil esterásica y poligalacturonásica, resulta el más adecuado (hidrólisis de los metil ésteres con depolimerización concomitante).

Dado que las publicaciones científicas en este campo habitualmente expresan la extensión de la hidrólisis como “grado de polimerización” (DP) y no como pesos moleculares, se debe tener en cuenta que una correlación aproximada (pero técnicamente útil) es la siguiente:

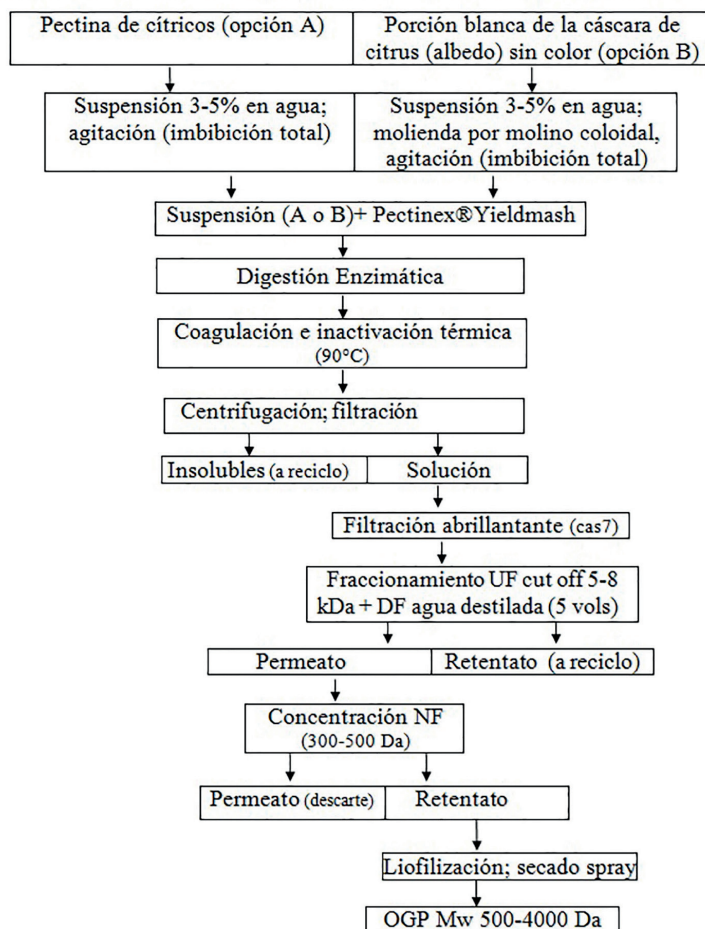
- DP 1 = 194 (peso molecular del ácido galacturónico)
- DP 2 =  $(194 \times 2) - 18 = 370$
- DP 3 =  $(194 \times 3) - (18 \times 2) = 546$
- DP 6 =  $(194 \times 6) - (18 \times 5) = 1074$
- DP 9 = 1602
- DP 10 = 1778
- DP 16 = 2834
- DP 20 = 3538

o más simplemente:

Peso molecular  $\approx 176 \times \text{DP}$

en donde  $176 = \text{MW galacturónico} - \text{MW H}_2\text{O} = 194 - 18$ .

Figura 2.1: Producción de OGP por hidrólisis enzimática:  
método tentativo



UF= ultrafiltración; DF= diafiltración; NF= nanofiltración

Fuente: Elaboración propia, en base a referencias (9) (11) (12) (13)

### 2.1.1.2 Métodos de hidrólisis ácida

Frente a la efectividad de las modernas preparaciones enzimáticas, los métodos de hidrólisis ácida han sido parcialmente desplazados de la práctica técnica. Mucho más comunes son los procesos que comparten el criterio de hidrólisis ácida combinada con procesos enzimáticos (12). El ácido empleado en la práctica fabril es HCl a una concentración de 0,2 – 0,5 M a temperaturas de 85°C durante 1,5 horas o el tiempo y condiciones dictadas por los ensayos para la degradación de la pectina.

En todo caso, debe tenerse en cuenta que la pectina es sumamente sensible a mecanismos de  $\beta$ -eliminación, los cuales suceden a pH superiores a 4,5 (14). Por debajo de pH 3, la hidrólisis ácida ocurre depolimerizando el polisacárido, con la hidrólisis concomitante de los grupos metil éster, liberando  $\text{CH}_3\text{OH}$  al medio de reacción (14). El promisorio reemplazo de la hidrólisis clorhídrica convencional está dado por el desarrollo de procesos denominados “hidrotermolíticos” o de “conversión hidrotérmica”, realizados en el seno de agua pura, por lo cual ofrecen ventajas industriales importantes: son rápidos, limpios, compatibles con el entorno al eliminar etapas de desalado (eliminación de cloruro residual), etc.

Una reacción hidrotérmica es aquella realizada en el seno de agua en estado líquido y a elevada temperatura, en donde la presión endógena del sistema mantiene el agua en fase líquida (15). De manera que los procesos que tienen lugar entre el agua y el sustrato, en condiciones variables de temperatura y presión, son denominados “procesos de conversión hidrotérmica”. Cuando el proceso se lleva a cabo en el

seno de agua líquida (entonces, en condiciones subcríticas,  $T < 374^{\circ}\text{C}$  o  $647^{\circ}\text{K}$ ;  $P < 217$  atmósferas o  $22,0$  MPa), se denomina hidrotermólisis (conversión hidrotérmica propiamente dicha) y por arriba de las condiciones críticas, se acostumbra denominarlo “proceso en condiciones supercríticas” o “de alta temperatura” (16). Por debajo del punto crítico, las reacciones hidrolíticas que ocurren son fundamentalmente mediadas por iones y radicales libres (15).

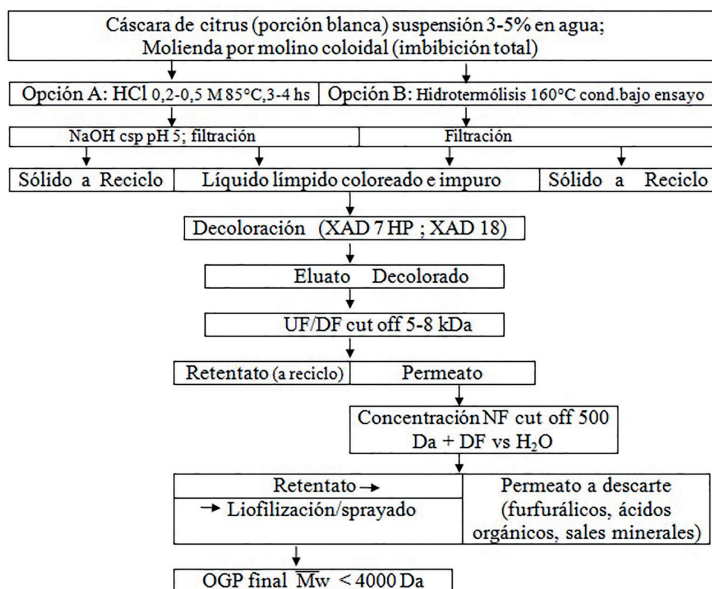
En condiciones hidrotérmicas (hidrotermólisis), la pectina sufre hidrólisis, generando oligogalacturónidos, fundamentalmente de grado de polimerización 2-10: la hidrólisis es el único mecanismo de reacción privilegiado durante los dos primeros minutos de conversión (15).

Las condiciones de proceso deben ser estudiadas meticolosamente en el laboratorio sobre moléculas “prototipo” (pectinas perfectamente caracterizadas) y, obviamente, sobre el sustrato real de reacción (sea pectina de grado técnico o cáscara de citrus privada de su porción coloreada). Ya sea que el polisacárido se someta a hidrólisis clorhídrica convencional o a hidrotermólisis, el producto resultante de la reacción presentará cuerpos coloreados, sustancias insaturadas y derivados furfurálicos. Esto obliga a una purificación para eliminar color y otras sustancias indeseables. Los pasos de decoloración se pueden hacer a través de procedimientos clásicos, tales como el uso de carbón activado o columnas de hidroxiapatita, o mucho más adecuadamente, empleando adsorbentes poliméricos (resinas de adsorción) (17). Los adsorbentes poliméricos son polímeros sólidos, porosos, no iónicos, insolubles, infusibles y de elevada superficie específica.

La combinación adecuada de las propiedades de polaridad, superficie específica y las interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas con el soluto a adsorber sobre esta fase continua sólida convierten a estas resinas en una excelente opción a la hora de decoloración de soluciones de carbohidratos (17). Las resinas adsorbentes Amberlite™ XAD 7 HP, XAD 18 y XAD 761 (Rohm-Haas, ahora Dow Chemical Co.) encuentran amplia aceptación para la remoción de impurezas coloreadas de soluciones acuosas de polisacáridos (17) (18). Martínez et al (19) han estudiado la hidrotermólisis de pectina; obtuvieron un rendimiento de 25% en oligosacáridos sobre peso de cáscara inicial, operando la reacción a 160°C en condiciones controladas (19).

La Figura 2.2 intenta representar el diagrama de flujo tentativo para un proceso de hidrólisis ácida y/o hidrotermolítica de pectina de citrus.

**Figura 2.2: Producción de OGP por hidrólisis clorhídrica y/o hidrotérmolítica de la pectina de citrus**



**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (12) (14) (15)(17)(18)(19)

### 2.1.1.3 Métodos radiolíticos

La irradiación de soluciones acuosas de polisacáridos y la radiólisis del agua pura serán revisados en detalle en (3.2.1.5).

En forma temprana, Skinner y Kertesz (20) estudiaron los efectos de la radiación y sobre la estructura de la pectina, habiendo procedido a irradiar pectina de cítricos en estado sólido. Este grupo de investigación registró el descenso del

peso molecular medio vía una escisión al azar de la cadena polisacarídica, habiendo demostrado también que no todos los fragmentos presentaban idéntica distribución carga/masa (mayor o menor densidad de grupos carboxilo esterificados en cada fragmento).

Posteriormente se hizo evidente que la intensidad de la degradación aumentaba con el incremento de la humedad de la muestra (21). Más recientemente se publicó un excelente y conciso estudio (22) que investiga y compara los efectos de la radiación sobre diferentes polisacáridos, entre los que se encuentran las pectinas, los alginatos y los carragenanos. La irradiación se efectuó sobre muestras sólidas y sobre el carbohidrato en solución acuosa a dosis crecientes de irradiación: los productos resultantes demostraron interesante estimulación en la producción de fitoalexinas en ensayos sobre vegetales, así como la reducción del stress ambiental producido sobre el vegetal por exceso de salinidad y presencia de metales pesados.

En resumen, se pueden puntualizar los siguientes criterios fundamentales para comenzar un estudio de desarrollo de OGP por métodos radiolíticos (23) (24), a saber:

- Concentración de la solución de pectina en agua: 2-3%.
- Dosis de radiación  $\gamma$ : 2,5-15 kGy (2,5 kGy/hr).
- El descenso del peso molecular promedio es mayor conforme aumenta la temperatura de la solución.
- El descenso del peso molecular promedio depende del grado de esterificación (metoxilación) de la dextrina ensayada.
- Se verifica incremento de la concentración de monosacáridos con el aumento de la dosis de radiación.



En base a lo expuesto, se hace evidente que son necesarias etapas de ultrafiltración, diafiltración y nanofiltración para aislar y purificar adecuadamente la fracción seleccionada de OGP (con eliminación de monómeros, cuerpos coloreados, etc.). Los conceptos vertidos en la Figura 2.2 pueden ser fácilmente interpretados en el caso de la aplicación de métodos radiolíticos. Sin embargo, puede ser útil considerar la siguientes modificación: parece bien establecido que la bioactividad sobre vegetales de los OGP disminuye cuando los grupos carboxilo se encuentran esterificados (2.1).

Si esto es así, puede ser interesante el ensayo de un proceso mixto que emplee una primera etapa de hidrólisis enzimática metilesterásica (Pectinex®) o bien (y más simplemente), una etapa de hidrólisis alcalina (saponificación de metilésteres) ya descrita (11) (ver 2.1.1.1), seguida de posterior neutralización a pH neutro o ligeramente ácido (pH 5-7) y subsiguiente irradiación de la solución acuosa así tratada. El cloruro de sodio generado se elimina en las posteriores etapas de diálisis ya mencionadas.

#### **2.1.1.4 Depolimerización óxido-reductiva (Procesos Fenton)**

En (3.2.1.4) se presenta una explicación detallada de los procesos de tipo Fenton aplicados a la depolimerización de polisacáridos, en particular, quitosanos, debido a que el método es ampliamente usado para la producción de quitoooligosacarinas. En la actualidad, el uso de estas reacciones aplicadas a la degradación de pectinas no han alcanzado la aplicabilidad industrial que tienen en la producción de otras oligosacarinas.

Es verdad que la degradación de carbohidratos vía Fenton es bien conocida desde largo tiempo atrás (25) (26), pero solamente en fecha reciente aparece en la bibliografía científica el detalle y la aplicación de este tipo de reacciones en el campo que se está tratando en esta contribución.

Vreeburg y colaboradores presentan un excelente estudio sobre las alteraciones microestructurales que produce el ataque del radical hidroxilo sobre la cadena de los polisacáridos (27) y Marritt (28) genera un excelente documento patentario donde no solo efectúa una exhaustiva revisión bibliográfica del arte previo, sino que presenta métodos sumamente claros de obtención de oligosacáridos de pectinas y de alginatos, lo que hace superfluo abundar en el tema. Sin embargo, es interesante destacar la elevada concentración de polisacárido en solución acuosa a procesar, lo que optimiza la producción y adaptabilidad industrial.

Recientemente, se ha investigado un nuevo tipo de reacciones de depolimerización de pectinas (y de polisacáridos en general), producidas por degradación fotoquímica del polisacárido.

Efectivamente, si bien las reacciones fotoquímicas de los carbohidratos han sido largamente conocidas y revisadas (29), últimamente, ha sido publicada la depolimerización parcial de la pectina a través de una reacción fotoquímica, no investigada con anterioridad (30).

Si bien la reacción citada (30) no es estrictamente un proceso Fenton, está estrechamente relacionada, puesto que puede ser activada por la presencia de  $H_2O_2$  (procesos Fenton fotoasistidos) y por tal motivo, se la cita en este punto.

Este grupo de investigación utiliza un proceso fotoquí-

mico de depolimerización a través del uso de luz UV, asistido por la presencia de  $\text{TiO}_2$  (30), procediendo luego a una caracterización exhaustiva de los productos de reacción con resultados sumamente promisorios por sus rendimientos y su direccionalidad, además de su compatibilidad ambiental.

## **2.2 Oligosacáridos de xiloglucanos (xiloglucanooligosacáridos, XGO)**

Los xiloglucanos son polisacáridos hemicelulósicos presentes en la pared celular de las plantas superiores, consistentes en una cadena de beta-D-(1-4) glucano con residuos de xilosa vinculados a la posición 6 de los restos glucosados (31); la depolimerización de estos polisacáridos son oligosacarinas (xiloglucanooligosacáridos, XGO) directamente involucrados en el desarrollo y metabolismo de los vegetales. Los xiloglucanos y los xilanos son los tipos más importantes de hemicelulosas presentes en la pared celular. Sin embargo, los xiloglucanooligosacáridos, junto con las fructo-oligosacarinas no han recibido el caudal de estudios científicos e industriales que sí han merecido otras clases de oligosacarinas.

### **2.2.1 Métodos de producción de XGO**

Conceptualmente, los oligosacáridos de xiloglucanos se pueden obtener con los mismos métodos que se aplican para la obtención de otras oligosacarinas. Sin embargo, los métodos

de hidrólisis enzimática son, con mucho, los más utilizados en la práctica técnica. En todo caso, se revisarán todos los métodos, con fines de revisión bibliográfica histórica. Las materias primas industriales para la obtención de XGO son los polisacáridos contenidos en la semilla de tamarindo y, quizá en mucha menor extensión, subproductos obtenidos de la industrialización de la manzana. Se encuentra disponible una excelente revisión bibliográfica sobre los xiloglucanos de semilla de tamarindo, que incluye datos estructurales, propiedades fisicoquímicas y aplicaciones industriales (32).

### **2.2.1.1 Hidrólisis enzimática de xiloglucanos**

La hidrólisis enzimática de xiloglucanos (semilla de tamarindo) se lleva a cabo con enzimas xiloglucanasas (xiloglucano-específico endo-beta-1,4-glucanasa): representantes característicos de tales enzimas las tenemos en las marcas comerciales Xiloglucanase GH 74 o Xiloglucanase GH 5 (Megazime), Ultraflo® Max, Ultraflo® L (Novozimes). Este tipo de procesos enzimáticos sigue un esquema fundamental que responde a las investigaciones de Misaki et al (33), el cual obtiene XGO de peso molecular medio (600-3000 Da), útiles para la inducción de fitoalexina en los vegetales, además de presentar otros usos tales como mantener la frescura de las verduras cortadas en rodajas (33). Este relevante documento (del cual se aconseja su estudio) enseña los siguientes puntos fundamentales:

- El método utiliza semillas de tamarindo como material de partida, del cual obtiene una fracción de xiloglucano perfectamente caracterizada.
- Hidrólisis enzimática y posterior fraccionamiento con

resina de intercambio iónico para obtener la fracción de XGO deseada.

- Caracterización del producto obtenido por criterios de HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) versus muestras de referencia, obteniendo así un material que contiene 5 a 9 monómeros en su constitución estructural (peso molecular medio: 600-3000 Da).

Las sustancias de referencia (patrón) se pueden obtener de fuentes comerciales confiables, por ejemplo, Oligotech® (34) y el aislamiento del xiloglucano de semilla de tamarindo puede obtenerse mediante el procedimiento indicado por Misaki et al (33) o bien acorde con los muy claros criterios publicados por Bashir, Sharma y Warsi (35), quienes además proporcionan una excelente caracterización del xiloglucano obtenido (20% sobre semilla).

La asequibilidad de esta excelente publicación hace superfluo todo comentario, ya que brinda un método de obtención de xiloglucano de semilla de tamarindo perfectamente adaptado para ser practicado a escala técnica.

Strickland y colaboradores (36) practican una eficiente separación de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática a través de métodos semipreparativos de HPSEC. En la práctica industrial, estos métodos pueden ser reemplazados por los procesos de separación y purificación por tecnologías de membrana (ultrafiltración UF, diafiltración DF, nanofiltración NF).

En este punto es conveniente aclarar que estos métodos enzimáticos son facilitados por la diversa variedad de enzimas industriales que se ofrecen en la actualidad, general-

mente producidas por grandes corporaciones fabriles (Novozymes®, Dyadic®, etc.).

Los criterios expuestos y referenciados permiten obtener XGO en estado prácticamente puro en relación a la ausencia de contaminación con otro tipo de oligosacáridos, los cuales pueden provenir del proceso de hidrólisis enzimática cuando se parte de material vegetal “crudo” o tal cual. Probablemente eso sea lo indicado cuando el XGO se destina a usos biofarmacéuticos. Sin embargo, se debe hacer notar que oligosacáridos “mixtos” han revelado poseer buena bioactividad vegetal. Tal es el caso de investigaciones dedicadas a la obtención de oligosacarinas obtenidas a partir de sub-productos de la industria vitivinícola, concretamente, utilizando callos (brotes) de parra para vino como materia prima vegetal (37). Si bien en esta referencia bibliográfica se emplean métodos de investigación no adaptables a la técnica industrial, resulta claro que el producto oligosacárido final no es estrictamente XGO; sin embargo, parece desplegar promisorio bioactividad.

La otra materia prima industrial, en principio disponible para la obtención de XGO, es la pulpa de manzana que proviene de la fabricación de zumo. Este material de desecho se produce en enormes cantidades, dado que la manzana es la fruta más utilizada para la obtención de jugo (38).

Acorde con esta autorizada revisión histórica bibliográfica (38), esta materia prima tan asequible presenta importantes problemas para su utilización, no solo para la obtención de XGO, sino también para su empleo en la obtención de materiales varios. En el caso de las XGO, las dificultades pueden resumirse así, acorde con Rabetafika et al (38):

- Los rendimientos de obtención de xiloglucanos a partir de la pulpa de manzana (en donde están presentes junto con pectinas y celulosa) son bajos. El método industrial de obtención es la extracción de la pulpa con soluciones de NaOH o KOH de alta molaridad (3-4 M). Sin embargo, el trabajo con grandes cantidades de estos reactivos obliga a su recuperación, añadiendo dificultades.
- Una despectinización enzimática previa de la pulpa afecta al peso molecular medio del xiloglucano obtenido.
- El rendimiento puede ser mejorado practicando la extracción alcalina con 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  a pH 12,5.
- Otros procedimientos alternativos, tales como la extracción alcalina asistida por ultrasonido (39), no parecen ser industrialmente aplicables.
- En todo caso, por lo menos hasta el año 2014, no hubo desarrollo industrial de métodos para la obtención de hemicelulosas a partir de pulpa de manzana, como así tampoco hubo reportes de producción industrial de oligosacáridos partiendo de esta fuente vegetal de desecho (38).

### **2.2.1.2 Revisión de otros métodos de obtención teóricamente posibles**

Los métodos de depolimerización de xiloglucanos por medio de radiación  $\gamma$  se aplican para la obtención de oligosacáridos de xiloglucanos con actividad farmacéutica, pero no parecen ser relevantes a la hora de obtener XGO con fines agrícolas. La irradiación  $\gamma$  del polvo de semilla de tamarindo ha facilitado la extracción del xiloglucano de la misma; sin embargo, se ha observado degradación del polisacárido aislado (40). De todas maneras, se puede consultar una au-

torizada tesis de doctorado que investiga en profundidad la irradiación y de xiloglucano con fines biomédicos (41) (42).

Por otra parte, los métodos de hidrólisis ácida no pueden competir contra la excelencia de los métodos enzimáticos y en lo relativo a procesos hidrotermolíticos (véase 2.1.1.2), el presente autor no tiene conocimiento sobre su utilización industrial para la producción de XGO destinados a usos agrícolas.

No obstante, la obtención de oligosacáridos a partir de residuos agrícolas o agroindustriales está ampliamente documentada (43) (44) (45) (46), donde se incluye el caso particular de los xilooligosacáridos (47).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Izquierdo Oviedo, H. (2009). “Los oligogalacturónidos de origen péctico y su acción en las plantas”. *Temas de Ciencia y Tecnología* 13 (39): 31-40.  
[http://www.utm.mx/edi\\_anteriores/Temas39/2NOTAS%2039-1.pdf](http://www.utm.mx/edi_anteriores/Temas39/2NOTAS%2039-1.pdf).
- 2) Bosco, J.; Miertus, S.; Turchini, S.; Prosperi, T.; Ascone, I.; Rizzo, R. (2001). “Structural studies on polygalacturonate gels: an EXAFS investigation combined with molecular modeling”. *Carbohydr. Polym.* 119(1): 134-145.  
doi: 10.1016/S0144-8617(00)00339-8.
- 3) Singthong, J.; Ningsanond, S.; Cui, S.; Goff, H.D. (2005). “Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin”. *Food Hydrocolloids* 19(5): 793-801. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.09.007.  
[http://www.academia.edu/5149536/Extraction\\_and\\_physicochemical\\_characterization\\_of\\_Krueo\\_Ma\\_Noy\\_pectin](http://www.academia.edu/5149536/Extraction_and_physicochemical_characterization_of_Krueo_Ma_Noy_pectin).
- 4) Cabrera, J.C. (2000). “Obtención de una mezcla de oligogalacturónidos a partir de corteza de cítricos”. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Químicas (INCA).
- 5) Cabrera, J.C.; Gómez, R.; Diosdado, E.; Hormaza, J.V.; Iglesias, R. y otros (2003). “Procedimiento de obtención de una mezcla de oligosacáridos pécticos estimuladora del enraizamiento vegetal”. Patente cubana CU 22859 A1 (resolución 155/2003, OCPI, Cuba). <http://resultados.redciencia.cu/mujeres/descripmujeres/t17198.pdf>.

- 6) Pectimorf® (sin fecha) (consultado el 4 de abril de 2017). [www.ecured.cu/Pectimorf](http://www.ecured.cu/Pectimorf).
- 7) Schweizerische Ferment AG (SFAG) (1980). “La utilización de enzimas en la industria de los zumos de frutas”. Instructivo FJ/500/1/8.80/E.
- 8) Rodrigues, S. (2012). “Enzyme maceration” in “Advances in Fruit Processing Technologies” (Rodrigues, S.; Fernandes, F.A.N. eds.; CRC Press, ISBN 978-1-4392-5152-4): 235-246.
- 9) Novozymes® (2012). Pectinex® Yielmash Extra. Product Data Sheet (no code): 1-2.
- 10) Izquierdo, H.; González, M.C.; Núñez, M.; Proenza, R.; Cabrera, J.C. (2009). “Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatización de vitroplantas de banano (*Musa spp*) del clon “FHIA-18” (AAAB)”. *Cultivos Tropicales* 30(1): 37-42.  
[www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217899006](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217899006).
- 11) Komae, K.; Komae, A.; Misaki, A. (1990). “A 4-5 insaturated low molecular weight oligogalacturonide as a potent phytoalexin-elicitor isolated from polygalacturonide of *Ficus awkeotsang*”. *Agric. Biol. Chem.* 54(6): 1484-1490.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/54/6/54\\_6\\_1477/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1961/54/6/54_6_1477/_pdf).
- 12) Kuntz, M.; Munir, M.; Vogel, M. (2011). “Method for producing pectin hydrolysis products”. U.S. Patent 7960351 B2.
- 13) Deconinck, T.J.; Ciza, A.; Sinnaeve, G.M.; Laloux, J.T.; Thonart, P. (2000). “High performance anion-exchange chromatography - DAD as a tool for the identification and quantification of oligogalacturonic acids in pectin

- depolymerisation". *Carbohydr. Res.* 329(4): 907-911.  
doi: 10.1016/S0008-6215(00)00253-6.
- 14) Sila, D.N.; Van Buggenhout, S.; Duvetter, T.; Fraeye, L. and others (2009). "Pectins in processed fruits and vegetables: Part II – Structure-function relationships". *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 8: 86-104.  
doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x/full>.
  - 15) Castro Vega, A.A.; Rodríguez Varela, L.I.; Díaz Velázquez, J. de J. (2007). "Conversión hidrotérmica subcrítica de residuos orgánicos y biomasa. Mecanismos de reacción". *Rev. Ing. Inv.* 27(1): 41-50.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-56092007000100006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56092007000100006).
  - 16) Díaz, V.B. (2016). *Conversión técnica de proteínas. Valorización de desechos proteicos* (AMV Ediciones, Madrid, I ed. ISBN 978-84-945558-3-1): 190-193.
  - 17) Díaz, V.B. (2017). *Polisacáridos industriales de interés farmacéutico. Aislamiento, purificación, fraccionamiento* (AMV Ediciones, Madrid, I ed.. ISBN 978-84-945166-6-5): 42-47.
  - 18) "Ion exchange Resins, adsorbent resins, chromatographic resins in food industry" (no date).  
[www.biokal.com/assets/uploads/Ion-exchange\\_and\\_adsorbent\\_resins\\_for\\_food\\_industry.pdf](http://www.biokal.com/assets/uploads/Ion-exchange_and_adsorbent_resins_for_food_industry.pdf).
  - 19) Martínez, M.; Yáñez, R.; Alonso, J.L.; Parajó, J.C. (2010). "Chemical production of pectic oligosaccharides from orange peel wastes". *Ind. Eng. Chem. Res.* 49(18): 8470-8476. doi: 10.1021/ie101066m.

- 20) Skinner, E.R.; Kertesz, Z.I. (1960). "The effect of gamma radiation on the structure of pectin". An electrophoretic study. *J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chemistry* 47(149): 99-109. doi: 10.1002/pol.1960.1204714910.
- 21) Wahba, I.J.; Massey, L.M. (1966). "Degradation of pectin by  $\gamma$ -radiation under various moisture conditions". *J. Polymer Sci: Part A-1*, 4:1759-1771. doi: 10.1002/pol.1966.150040710.
- 22) Kume, T.; Nagasawa, N.; Matsushashi, S.; Ishioka, N.S. and others (2000). "Radiation degradation of carbohydrates and their biological activities for plants". *JAERI – Conf. 2000-001*.  
[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/31/049/31049891.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/31/049/31049891.pdf)
- 23) Kang, H-J.; Jo, Ch.; Kwon, J-H.; Jeong, I-Y.; Byun, M-W. (2005). "Physicochemical characteristics and biological activity of irradiated pectin solution". *Korean J. Food Sci. and Technol.* 37(5): 741-745 (in Korean).
- 24) Inamura, P.; del Mastro, N.L. (2007). "Radiation sensitivity of different citric pectins. INAC 2007 International Atlantic Conference. Nuclear Energy and Energetic Challenges for 21st Century". 15th Brazilian National Meeting on Reactor Physics and Thermal Hydraulics. 8 Brazilian National Meeting on Nuclear Applications. Santos, SP (Brasil).  
[https://www.researchgate.net/profile/Neli-da\\_Del\\_Mastro/publication/228494513\\_RADIA-TION\\_SENSITIVITY\\_OF\\_DIFFERENT\\_CITRIC\\_PECTINS/links/5654b44a08ae1ef92976d029/RADIA-](https://www.researchgate.net/profile/Neli-da_Del_Mastro/publication/228494513_RADIA-TION_SENSITIVITY_OF_DIFFERENT_CITRIC_PECTINS/links/5654b44a08ae1ef92976d029/RADIA-)

- TION-SENSITIVITY-OF-DIFFERENT-CI-TRIC-PECTINS.pdf?origin=publication\_list.
- 25) Moody, G.J. (1964). "The action of hydrogen peroxide on carbohydrates and related compounds". *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.* 19: 149-179.  
doi: 10.1016/S0096-5332(08)60281-7.
  - 26) Isbell, H.J.; Frush, H.L.; Parks, E.W. (1976). "Degradation of non-reducing carbohydrates by alkaline hydrogen peroxide and a ferrous salt". *Carbohydr. Res.* 51: C5-C9.  
doi: 10.1016/S0008-6215(00)84047-1.
  - 27) Vreeburg, R.A.M.; Airianah, O.B.; Fry, S.C. (2014). "Fingerprinting of hydroxyl radical-attacked polysaccharides by N-isopropyl-2-aminoacridone labeling". *Biochem. J.* 463: 225-237. doi: 10.1042/B120140678.  
[www.biochemj.org/content/ppbiochemj/463/2/225.full.pdf](http://www.biochemj.org/content/ppbiochemj/463/2/225.full.pdf).
  - 28) Marritt, W. (2005). "Process for the manufacture of polyuronic acids". U.S. Patent 6903209 B2.
  - 29) Binkley, R.W. (1981). "Photochemical reactions of carbohydrates". *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38: 105-193. doi: 10.1016/S0065-2318(08)60310-8.
  - 30) Burana-Osot, J.; Soonthornchareonnon, N.; Hosoyama, S.; Linhardt, R.J.; Toida, T. (2010). "Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction". *Carbohydr. Res.* 345: 1205-1210. doi: 10.1016/j.carres.2010.04.007.  
<http://www-heparin.rpi.edu/main/files/papers/505Carb%20Res%20tt10%20copy.pdf>.
  - 31) Fry, S.C.; Aldington, S.; Hetherington, P.R.; Aitken, J.

- (1993). "Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall". *Plant Physiol.* 103(1): 1-5.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC158939/pdf/1030001.pdf>.
- 32) Mishra, A.; Malhotra, A.V. (2009). "Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential". *J. Mater. Chem.* 19: 8528-8536.  
 doi: 10.1039/b911150f.
  - 33) Misaki, A.; Sekiya, K.; Yamatoya, K. (1997). "Agent for inducing phytoalexin and method for inducing phytoalexin". U.S. Patent 5602111.
  - 34) Elicityl-Oligotech® (2012). *The Library of Complex Sugars; Product catalogue*, 4th Ed. Xyloglucan, pp. 14.  
[www.elicityl-oligotech.com](http://www.elicityl-oligotech.com).
  - 35) Bashir, A.; Sharma, P.K.; Warsi, M.H. (2016). "Extraction and characterization of xyloglucan (Tamarind seed polysaccharide) as pharmaceutical excipient". *World J. Pharmacy and Pharm. Sci.* 5(6): 2209-2220.  
 doi: 10.20959/wjpps20166-7021. file:///D:/Descargas/article\_wipps\_1465023706%20(4).pdf.
  - 36) Strickland, F.; Pelley, R.; Albersheim, P.; Darvill, A. and others (2001). "Inhibition of UV induced immune-suppression and interleukin-10 production by cytoprotective tamarind oligosaccharides". U.S. Patent 6251878 B1.
  - 37) Campbell, J.A.; Drake, A.M.; Lee, V.W.K.; Strother, S. (1995). "A putative oligosaccharin growth promoter from *Vitis Vinifera* L. primary cell walls". *Annals of Botany* 75: 359-363. doi: 10.1006/anbo.1995.1033.
  - 38) Rabetafika, H.N.; Bchir, B.; Blecker, Ch.; Richel, A. (2014). "Fractionation of apple by-products as source

- of new ingredients: current situation and perspectives”. *Trends in Food Sci. Technol.* 40: 99-114.  
doi: 10.1016/j.tifs.2014.08.004.
- 39) Fu, C.; Tian, H.; Li, Q.; Du, W. and others (2006). “Ultrasound-assisted extraction of xyloglucan from apple pomace”. *Ultrasonics Sonochemistry* 13(6): 511-516.  
doi: 10.1016/j.ultrasonch.2005.09.007.
- 40) Choi, J.; Kim, J-K.; Srinivasan, P.; Kim, J-H., and others (2009). “Comparison of gamma rays and electron beam irradiation on extraction yield, morphological and antioxidant properties of polysaccharides from tamarind seed”. *Rad. Phys. and Chem.* 78(7-8): 605-609. doi: 10.1016/j.radphyschem.2009.04.004.  
<http://pack.korea.ac.kr/non/100.pdf>.
- 41) Todaro, S. (2015). “Xyloglucan self-assembled nanostructures and gels for biomedical applications”. PhD Thesis (Chemical Engineering). Univ. degli Studi di Palermo (Italia).  
<https://core.ac.uk/download/pdf/53299174.pdf>.
- 42) Todavro, S.; Sabatino, M.A.; Ajovalasit, A.; Ditta, L.A. and others (2016). “Radiation engineering of xyloglucans hydrogels”. *Chem. Eng. Transactions* 49: 289-294.  
doi: 10.3303/CET1649049. [www.aidic.it/cet/16/49/049.pdf](http://www.aidic.it/cet/16/49/049.pdf).
- 43) Cárdenas-Toro, F.P.; Alcázar-Alay, S.C.; Forster-Carneiro, T.; Meireles, M.A. (2014). “Obtaining oligo- and monosaccharides from agroindustrial and agricultural residues using hydrothermal treatments”. *Food and Public Health* 4(3): 123-139.  
doi: 10.5923/j.fph.20140403.08

- <http://article.sapub.org/10.5923.j.fph.20140403.08.html>.
- 44) Pu, Y.; Hu, F.; Huang, F.; Davison, B.H.; Ragauskas, A.J. (2013). "Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments". *Biotechnol. for Biofuels* 6: 15 (13 pp).  
doi: 10.1186/1754-6834-6-15.  
[www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/15](http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/15).
- 45) Khuwijitjaru, P. (2016). "Utilization of plant-based agricultural waste by subcritical water treatment". *Japan J. Food Eng.* 17(2): 33-39.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfe/17/2/17\\_33/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsfe/17/2/17_33/_pdf).
- 46) Li, H.; Chen, X.; Ren, J.; Deng, H.; Peng, F.; Sun, R. (2015). "Functional relationship of furfural yields and the hemicellulose-derived sugars in the hydrolysate from corncob by microwave-assisted hydrothermal pretreatment". *Biotechnol. Biofuels* 8: 127(12 pp).  
doi: 10.1186/s13068-015-0314-z.  
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-015-0314-z>.
- 47) Qing, Q.; Li, H.; Kumar, R.; Wyman, Ch.E. (2013). "Xylooligosaccharide production, quantification and characterization in context of lignocellulosic biomass pretreatment" in "Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals" (Wyman, Ch. E. ed. J. Wiley and Sons, ltd.): 392-415.  
doi: 10.1002/9780470975831.ch19.  
[http://bioenergycenter.org/besc/publications/AqueousPretreatment\\_19.pdf](http://bioenergycenter.org/besc/publications/AqueousPretreatment_19.pdf).



**CAPÍTULO 3**

**OLIGOSACÁRIDOS  
DE  $\beta$ -GLUCANOS Y  
QUITOOLIGOSCARINAS  
PRODUCCIÓN QUÍMICA**



## **3.1 Oligosacáridos de $\beta$ -glucanos**

Conforme a lo que ha sido expuesto (véase 1.3), las oligosacarinas derivadas de  $\beta$ -glucanos se obtienen comercialmente en base a la utilización, como materia prima de partida, de desechos industriales generados en gran cantidad y, por tanto, asequibles y de escaso costo.

En este caso, tales desechos están constituidos por subproductos de elaboración industrial de levaduras de panificación (levadura de cerveza) y de la producción cervecera (fundamentalmente, restos de levaduras y de grano agotado, denominado “brewers’ spent grain” en idioma inglés, o BSG por sus siglas en ese idioma). Estas industrias generan también descartes de la producción de extracto de levadura y de la producción de extracto de malta, procesos que se revisarán a continuación.

### **3.1.1 Residuos de levaduras como materia prima**

A pesar de que las levaduras naturales presentes en el suelo y habitantes comunes de hojas, tallos y frutos han recibido reciente atención en tanto que ejercen potente bioactividad

contra agentes patógenos de las plantas y promueven su crecimiento (1), no será este el caso a desarrollar, sino aquellos temas relacionados con la levadura de panificación (levaduras de cervecera, *Saccharomyces cerevisiae*).

Es bien conocido que la levadura de cerveza segrega extracelularmente ciertas glicoproteínas que contienen cadenas de polimánosa (2), como así también que la matriz de la pared celular de la levadura está conformada mayoritariamente de  $\beta$ -glucanos y la citada glicoproteína que contiene restos del azúcar manosa (3). De hecho, Huang (3) extrajo dos polisacáridos activos de la pared celular de la levadura y procedió a su aislamiento y caracterización basándose en criterios de diferente solubilidad: mientras que la manoproteína es soluble en medio alcalino, el (1 $\rightarrow$ 3)  $\beta$ -D-glucano es insoluble en este medio.

La presencia de estos polisacáridos ha permitido explicar los efectos benéficos que la levadura de cerveza presenta sobre la salud intestinal de seres humanos y animales (4) a través del bloqueo de las lectinas microbianas de patógenos que pueden colonizar el intestino.

Este hecho ha posibilitado el uso de estas fracciones carbohidráticas en la constitución de piensos para alimentación animal (4).

Los glucanos presentes en *S. cerevisiae* y su separación, aislamiento y aplicaciones prácticas en la fabricación de alimentos, piensos y suplementos dietarios, ha sido revisada muy recientemente (5).

Sin embargo, en la producción de alimentos, no siempre se utilizan los glucanos aislados y purificados: mucho más divulgado es el uso de los denominados “extractos de le-

vadura” (más correctamente hidrolizados de levadura”), tal como se los conoce en el vocabulario técnico y fabril.

El extracto de levadura es un producto largamente conocido y muy utilizado en la industria de la panificación (junto con el “extracto de malta”) como aditivo en alimentos funcionales, en cosmética y como parte de medios de cultivo microbiológicos.

Conceptualmente, los hidrolizados de levadura pueden obtenerse a través de dos métodos que se practican a escala industrial, a saber: hidrólisis y autólisis.

La hidrólisis de la célula de levadura habitualmente es asistida enzimáticamente a través del agregado de proteasas industriales, mientras que el proceso de autólisis se lleva a cabo por la acción propia de las enzimas contenidas en la célula de levadura, lo que conlleva la ruptura de la pared celular y el volcado del material celular al medio circundante (6).

Este volcado está constituido por polirribonucleótidos y nucleósidos (los que contribuyen al desarrollo de su aroma y sabor característicos), polisacáridos ya mencionados y polipéptidos de peso molecular variado que depende del grado de hidrólisis (7).

El extracto de levadura “convencional” o “histórico” es el obtenido por implementación de procesos autolíticos en condiciones adecuadas de tiempo y temperatura (6) (7), el cual, sin embargo, presenta bajos rendimientos y reducidas características organolépticas (6).

Los hidrolizados obtenidos por hidrólisis enzimática a través de la adición de enzimas externas presentan altos rendimientos y, en muchos casos, propiedades organolépticas resaltadas (6). La hidrólisis enzimática se hace casi invaria-

blemente con enzimas de procedencia fúngica o microbiana, industrialmente asequibles (por ejemplo, Flavourzyme®, Novozymes, Dinamarca), con lo cual también puede evitarse la aparición del “amargor” característico e indeseable en muchos proteolizados industriales (8).

Naturalmente, si el hidrolizado de levadura se destinará a la obtención de oligosacarinas y no de alimentos, la aparición de cierto sabor amargo es totalmente indiferente y podrán utilizarse variedad de preparados enzimáticos industriales (Savinase®, Novozymes; Purafect®, Genencor) igualmente efectivos.

A escala de laboratorio, el extracto de levadura tradicional (“convencional”, “histórico”), se puede obtener partiendo de levadura fresca prensada en panes, tal como se expende para usos de panificación (9) (10), de la siguiente manera:

- 1 kg de levadura prensada fresca se suspende con suave agitación mecánica en 1 volumen de agua desionizada (1 litro), calentando suavemente durante 24 h a una temperatura de 40-50°C sin interrumpir la agitación suave.
- Enfriar espontáneamente con ayuda de baño de agua de grifo.
- Filtración a vacío, preparando una precapa de HyFlo Supercel® como ayuda filtrante sobre el embudo de Büchner provisto de tela de rayón o papel de filtro grueso (Munktel®). El material sólido retenido está constituido por restos de la pared celular de levadura y el líquido filtrado constituye el hidrolizado de levadura (si se desea recuperar el material celular insoluble, efectuar la separación por centrifugación en lugar de la filtración con ayuda filtrante).

- El líquido filtrado perfectamente límpido se evapora en evaporador rotatorio hasta llegar a la concentración de sólidos deseada (vacío, temperatura menor o igual a 40°C para evitar el desarrollo de color).

Se debe destacar que la moderna industria de bioprocesos ha dirigido sus esfuerzos a la producción de extractos de levadura obtenidos a partir de levaduras descarte de cervecerías, afinando las condiciones de obtención, y no ya solo de levadura virgen (6) (10), obteniéndose extractos de excelentes propiedades organolépticas.

Por cierto, la producción de extractos de desagradables características sensoriales (entre las que se incluye la coloración indeseable) ha sido tema de preocupación industrial durante décadas.

Harada y colaboradores (11) han desarrollado un interesante proceso de obtención de un extracto de levadura (*Candida subtilis*), de por sí naturalmente rica en ácidos ribonucleico, habiendo procedido a un calentamiento de la masa celular (80-120°C) y posterior tratamiento con 5'-fosfodiesterasa. Con ello se logra la conversión del ARN en 5'-nucleótidos, evitando la generación de 2' y de 3'- ribonucleótidos, con lo cual se logra un excelente sabor.

Kado et al (12) han propuesto un método relevante de obtención de extractos de levadura de baja coloración y sin olor indeseable. El método representa el estado actual del arte en la producción industrial de extractos de calidad superior destinados a alimentos y cosméticos.

El método en cuestión se refiere a extractos producidos por varios tipos de levaduras utilizadas a tal fin, como le-

vaduras de panificación, de cervecería y aún otros tipos de levadura, tal como Tórula. Con fines de esterilización, el extracto sufre un calentamiento a alta temperatura, con lo cual sucede la aparición de color pronunciado, olor indeseable (pardeamiento, reacción de Maillard) y corpúsculos insolubles (proteína desnaturalizada), eliminables por filtración, tras lo cual, sustancias de alto peso molecular son eliminadas a través de una eficiente etapa de ultrafiltración (UF), quedando presentes en el retentato (en donde también se sucede una primera etapa de eliminación de color) (13). El permeato de UF se somete a un proceso de adsorción/intercambio iónico que reduce la tasa de coloración a valores óptimos.

La cromatografía de adsorción sobre adsorbentes poliméricos y/o de intercambio iónico con fines de reducción de color de los hidrolizados proteicos (acompañados o no por ultrafiltración de simple o de doble paso) se encuentra recientemente revisada en la bibliografía técnica (13).

Por otra parte, la producción de hidrolizados de levadura destinados a usos agrotécnicos reposa sobre conceptos ligeramente diferentes, en donde no es importante el desarrollo de coloración, no se parte de levadura virgen, sino de levaduras descartadas de cervecías, y en donde resulta muy importante la hidrólisis de los glucanos de la célula de levadura, los que, a la postre, constituirán la base de las oligosacarinas deseadas. Dado que los glucanos forman parte de la pared celular de la levadura, parece claro que los restos de pared celular (debris) resultan más importantes que el volcado de material intracelular (componente mayoritario de los extractos de levadura destinados a alimentación y otros usos finos).



Por la misma razón, la presencia de oligopéptidos tampoco parece importante. Por el contrario, existen excelentes productos comerciales compuestos por la fracción oligosacáridica acompañada por hidrolizados proteicos, por ejemplo, derivados de pescado y percolados de compostaje (14).

El interesante documento patentario de Parrado Rubio (15) propone un procedimiento de obtención de una preparación de bioestimulantes vegetales a base de levaduras descartadas del proceso de fabricación de cerveza (beer spent yeast, BSY).

El documento (15) también proporciona una muy abundante reseña bibliográfica retrospectiva de los antecedentes publicados sobre el tema.

El proceso comprende suspender los restos de levadura y materiales provenientes de la fermentación alcohólica de la malta de cebada, en agua o suero procedente de la fabricación de quesos y calefaccionar a pH alcalino a 120°C bajo presión, a lo cual le sigue una proteólisis enzimática mediada por la adición de proteasas alcalinas o neutras (subtilisinas industriales). El líquido se separa del material insoluble por métodos conocidos y finalmente se concentra por etapas de ósmosis inversa (RO) o nanofiltración (NF).

Recientemente fue confirmado por Pujos (16) que las paredes celulares de levadura (industrialmente procedente de cervcerías, BSY), adecuadamente administradas al vegetal, estimula sus defensas inmunitarias, protegiendo al cultivo de fitopatógenos. Más aún, estos preparados resultaron aplicables a variedad de cultivos vegetales, entre ellos vid, caña de azúcar, cereales, árboles frutales, etc., incrementando la resistencia a las infecciones (16). Adecuadamente formula-

do, el insoluble constituye la fracción glucánica con actividad fitoprotectora y bioestimulante.

Por otra parte, la fracción insoluble de estos debris celulares puede ser enzimáticamente hidrolizada con el objeto de escindir suavemente los citados  $\beta$ -glucanos contenidos en los mismos para obtener los oligosacáridos correspondientes. Desde hace décadas existen excelentes preparados comerciales de betaglucanasas (obtenidas de *Trichoderma harzianum* (Glucanex®, Novozymes) (17), los cuales pueden ser aplicados para la producción de oligosacáridos a escala técnica. Estos procesos no han perdido interés en el tiempo, todo lo contrario. Dado que los glucanos son insolubles en alcohol al 30% (17), la extensión de la hidrólisis puede ser seguida eventualmente por métodos turbidimétricos.

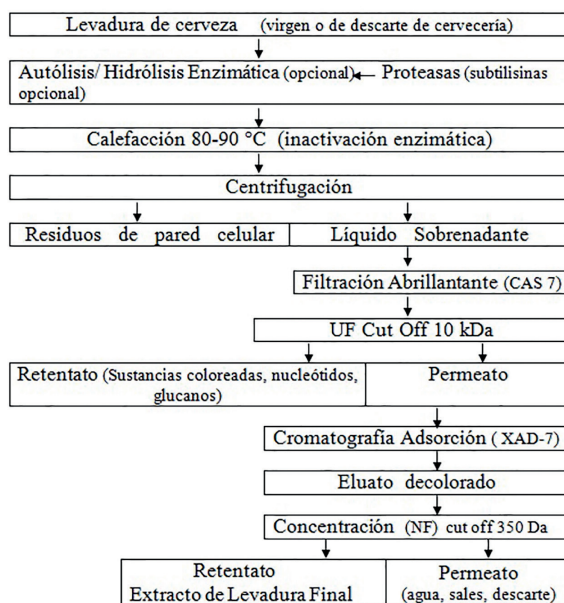
Esta es una forma sencilla de medir la tasa de desaparición de glucanos, dado que la reacción resulta sensible por arriba de 15 mg glucanos/litro de solución (17). Con concentraciones adecuadas de beta-glucanasas, la gran mayoría del contenido de beta-glucanos pasa a formar parte del sobrenadante líquido, proceso denominado de “solubilización de beta-glucanos” (en rigor, generación de oligómeros e incluso glucosa) (18) (19).

Producida la hidrólisis enzimática de los glucanos de pared de levadura al grado adecuado, se puede obtener la fracción deseada de oligosacáridos mediante fraccionamientos por tecnologías de ultrafiltración (si se lo creyera necesario).

En los gráficos 3.1, 3.2 y 3.3 se hace una comparación esquemática de posibles procesos de producción de extracto

de levadura para fines comestibles y de oligosacarinas de beta-glucanos (levaduras) con diferentes grados de purificación y fraccionamiento.

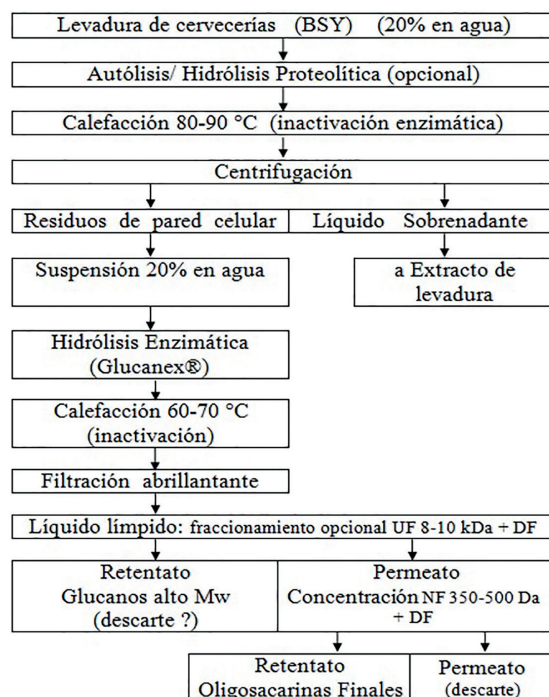
**Figura 3.1: Producción de extracto de levadura para alimentación y cosmética: método tentativo**



UF= ultrafiltración; NF= nanofiltración

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12)

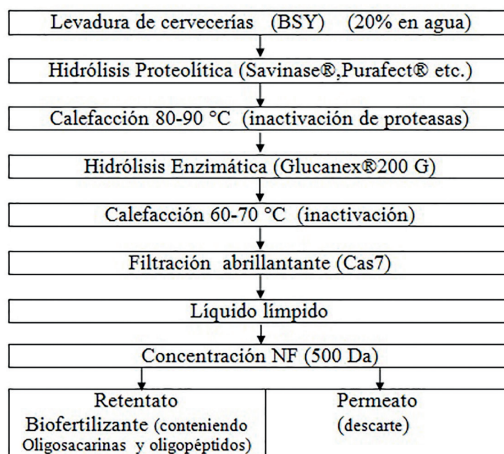
Figura 3.2: Producción de oligosacarinas de beta-glucanos de levadura:método tentativo “A”



UF= ultrafiltración; NF= nanofiltración;  
DF= Diafiltración con 2-5 volúmenes de agua (bajo ensayo)

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (15) (16) (17) (18) (19)

**Figura 3.3: Producción de oligosacarinas de beta-glucanos de levadura:método tentativo “B”**



NF= nanofiltración;

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (14)(15)(16)(17)(18)(19)

### 3.1.2 Consideraciones sobre el grano agotado de cervecería

La cebada se emplea en grandes cantidades en la industria de producción de cerveza, malta y extracto de malta, lo que genera ingentes cantidades de grano de cebada (habitualmente triturados) agotados por el proceso de malteado y

extracción de “mosto dulce” destinado a la producción de cerveza. El mosto también puede ser concentrado por evaporación, generando el denominado “extracto de malta”, producto de suma utilidad en la industria de la panificación. Para una magistral exposición sobre la fabricación de cerveza y malta, véase el libro escrito por J.S. Hough (20).

El BSG, inicialmente conteniendo en su composición  $\beta$ -glucanos (21) conforma hasta el 85% de los subproductos de la industria cervecera, siendo el resto mayoritariamente levaduras (22).

El BSG ha sido ensayado con el objeto de derivarlo para distintos usos, tales como productos panificados (panes cerveceros), barras de cereal, granolas, tratamiento de aguas de desecho, células de combustible, fabricación de piensos para alimentación animal (22) (23) (24). El BSG contiene polisacáridos tales como glucanos, hemicelulosas, xilanos y arabinanos, acompañados por proteínas e incluso ligninas (25).

El alto contenido de glucanos obliga a que en la producción de alimentos para aves a base de BSG se deba añadir  $\beta$ -glucanasas, en orden a digerir estos polisacáridos, no digeribles para estos animales (25).

Las enzimas de producción industrial son empleadas desde hace décadas en multiplicidad de operaciones técnicas vinculadas a la preparación de alimentos y bebidas: es interesante recordar que el uso adecuado de estas enzimas ha permitido en el pasado obtener cervezas con bajo o nulo contenido de cereales malteados (U-brew, unmalted brew), proceso desarrollado por Novo Nordisk (hoy Novozymes) en 1987, junto con el laboratorio de fermentación Alfred Jorgensen (26).

Continuamente se desarrollan valorables esfuerzos técnicos en la utilización del BSG (a veces denominado “bagazo de malta”), a los fines de incluirlo en la preparación de concentrados proteicos, antibióticos, enzimas, medios de cultivo para microorganismos, etc. (27), en la obtención de compuestos bioactivos (28), alimentos funcionales (29), extracción de arabinoxilanos (30), producción de bioetanol (31), etc.

Por lo demás, el extracto de malta fue ensayado para la protección de frutos cítricos (32) y en lo relativo a los temas tratados en la presente contribución, se debe destacar el promisorio empleo del BSG en la preparación de compost para la fertilidad de suelos y productividad de los cultivos (33).

### **3.1.3 Oligosacarinas glucánicas derivadas de otras fuentes**

Es importante destacar que, a la fecha actual, la exploración de otras fuentes de obtención de glucanooligosacarinas es incesante. El relevante trabajo llevado a cabo por Saigne-Souland y colaboradores (34) ha permitido obtener y ensayar con éxito glucanooligosacarinas obtenidas del ascomiceto patógeno de la vid *B. cinérea* y la protección de los viñedos, por aspersión de un extracto del cultivo del patógeno y posterior calefacción en autoclave. Este grupo de investigación ha obtenido alta concentración de las oligosacarinas en el extracto filtrado (8,5 g beta-glucano/litro) con un grado de depolimerización comprendido entre los valores 2-6 (aprox. 400-1200 Da).

El autor desea insistir sobre la enorme importancia industrial que, al respecto, representan los métodos basados en tecnologías de membrana, sean ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa, por su simplicidad, selectividad y rapidez; métodos, por otra parte, ampliamente conocidos y divulgados que incluyen el campo de los beta-glucanos (35).

## 3.2 Quitoooligosacarinas

Las quitoooligosacarinas (quitoooligosacáridos) son oligosacáridos del quitosano obtenidos por depolimerización profunda del mismo y posterior aislamiento y purificación de la fracción deseada. Estos oligómeros del quitosano han encontrado fecunda aplicación en el campo de la agricultura y otros cultivos vegetales como promotores del crecimiento de las plantas.

La quitina es un polisacárido compuesto por la repetición lineal de unidades de N-acetilglucosamina (2 acetamido 2 deoxiglucosa) enlazadas entre sí por enlaces  $\beta$  (1,4) (36). Se encuentra en la naturaleza en forma de microfibrillas ordenadas, de estructura cristalina, que constituyen el componente estructural del exoesqueleto de crustáceos, y de la pared celular de hongos y levaduras, lo que convierte a la quitina en el segundo polisacárido más abundante en la biomasa después de la celulosa (36).

El quitosano se produce a escala comercial por de-N-acetilación química de la quitina a través de la acción de bases fuertes, habitualmente en medio acuoso. Según las condiciones de reacción, se obtendrá un polisacárido con mayor o



menor grado de acetilación, pesos moleculares y coeficiente de polidispersidad, sea  $\overline{M}_w / \overline{M}_n$  (37).

La quitina es insoluble en agua y el quitosano es soluble en medio ácido debido a la formación del amonio correspondiente por protonación del grupo amino libre (37).

La información científica y técnica publicada sobre quitina y quitosano es prácticamente abrumadora y fácilmente asequible para el técnico interesado.

El excelente tratado editado por S-K Kim incluye un capítulo dedicado a la mejora en la producción de cultivos a través del uso de quitosanos y sus oligosacáridos (38); recientemente fue publicada una bibliografía técnica que revisa los aspectos industriales de los quitosanos y de las quito-oligosacarinas, incluidos sus métodos de producción (39), lo que permite obviar demasiados comentarios.

### 3.2.1 Métodos de producción

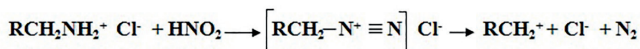
Las quitoooligosacarinas se pueden obtener a escala técnica depolimerizando el quitosano de partida (con determinado peso molecular  $M_w$ , polidispersidad y grado de N-acetilación) a través de varios procesos bien conocidos, a saber: depolimerización con ácido nitroso, depolimerización por hidrólisis ácida o enzimática, depolimerización oxido-reductiva y también por irradiación  $\gamma$ .

#### 3.2.1.1 Depolimerización con ácido nitroso

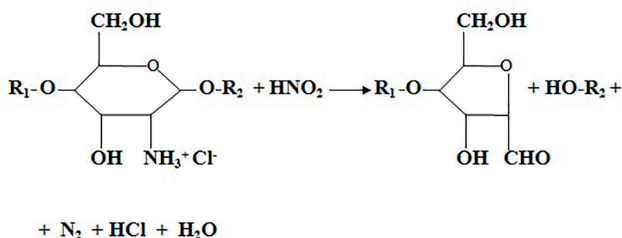
Cuando una amina alifática primaria se trata con  $\text{HNO}_2$  en medio clorhídrico, se forma la sal de diazonio correspondiente,

sumamente inestable, que se descompone espontáneamente liberando nitrógeno y un ión carbonio. A su vez, el ión carbonio reacciona para rendir productos secundarios (40) (41).

**Figura 3.4: Depolimerización de quitosano con  $\text{HNO}_2$  (deaminación)**



Considerando el resto glucosamínico dentro de la cadena del quitosano, la reacción con  $\text{HNO}_2$  sucederá según:



**Fuente: Elaboración propia en base a referencias (40) (41) (43)**

De acuerdo con lo expuesto, la cadena del oligosacárido así obtenido, tiene un extremo reductor formado por un resto de 2-5 anhidromanosa terminal.

Obsérvese que la reacción ocurre cuando el grupo amino se encuentra libre y no sucede si el amino está acetilado. La reacción con ácido nitroso es bien conocida en el campo de los aminoglicósidos y de los glicosaminoglicano sulfatos (42).

La formación del anhidroazúcar terminal generado en este tipo de reacciones también ha sido publicada (43) (44) y su utilidad se amplió a la obtención de oligosacáridos de

heparina (heparinas de bajo peso molecular, LMWH por sus siglas en inglés) de importancia farmacéutica (45).

Característicamente, las quitoooligosacarinas se obtienen por degradación de quitosano con ácido nitroso a través del método de E. Nakao (44).

El quitosano de partida se disuelve en solución acuosa de ácido acético o ácido clorhídrico (pH 2-4) y se hace reaccionar con solución de nitrito de sodio a una temperatura entre 0 y 5°C.

El  $\text{HNO}_2$  generado en medio ácido reacciona “in situ” con el polisacárido según se especificó (Nakao proporciona un interesante esquema de reacción) generando la mezcla de quitoooligosacáridos con un grupo terminal reductor de 2-5 anhidromanosa, el cual, con el fin de evitar reacciones secundarias en solución (por ejemplo, condensaciones carbonílicas, pardeamientos, etc.), se reduce con un reductor adecuado (el más común,  $\text{NaBH}_4$  en medio acuoso suavemente alcalino) para generar el 2-5 anhidromanitol correspondiente, característicamente poco reactivo.

La solución resultante se concentra y se fracciona en las diferentes especies moleculares a través del empleo de metanol o mezclas metanol-acetona (44).

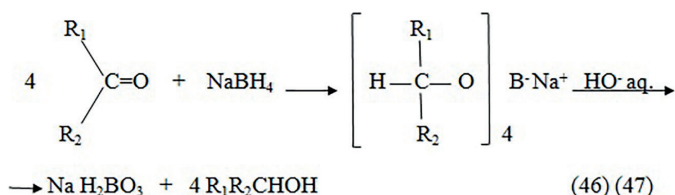
El excelente documento de Nakao proporciona el sustento de toda operatoria de obtención de quitoooligosacarinas vía reacción con  $\text{HNO}_2$ . Como se puede observar, el método de fraccionamiento con solventes orgánicos puede completarse o sustituirse por completo empleando procesos de ultrafiltración con distintos pesos moleculares de corte (cut off) y nanofiltración (NF).

En este punto, puede ser interesante detenerse en el pro-

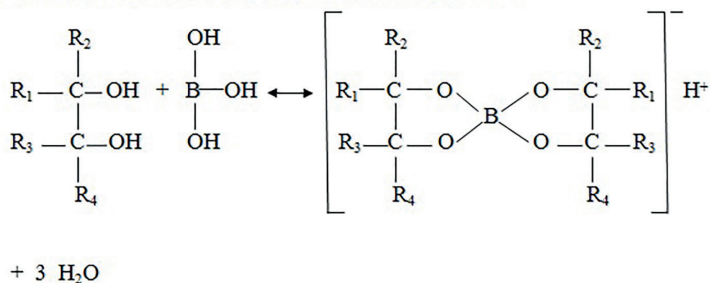
ceso de reducción del citado grupo terminal anhidromanósico con borohidruro de sodio. Los polialcoholes reaccionan con el ácido bórico (borato, en realidad), combinándose 2 moles de cis-poliol vecinal con un mol de ácido bórico para formar un complejo de naturaleza reversible.

El esquema total de reducción de anhidromanosa con  $\text{NaBH}_4$  y posterior combinación del ácido bórico con el polialcohol anhidromanitol puede representarse así:

Figura 3.5: Reacción del  $\text{NaBH}_4$  sobre carbohidratos reductores y formación del éster bórico correspondiente



El metaborato formado constituye ésteres bóricos con dioles vecinales, tales como el alditol correspondiente generado en la reducción:



Fuente: Elaboración propia en base a referencias (44) (46) (47) (48)

Si, por ejemplo, en 100 ml de agua se disuelven 1-2 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , alcalinizada con gotas de solución de NaOH hasta llevar a color rojo violáceo de fenoltaleína y en ella se disuelven algunos gramos del carbohidrato que contengan el diol vecinal, se observará que el color rosado desaparece lentamente.

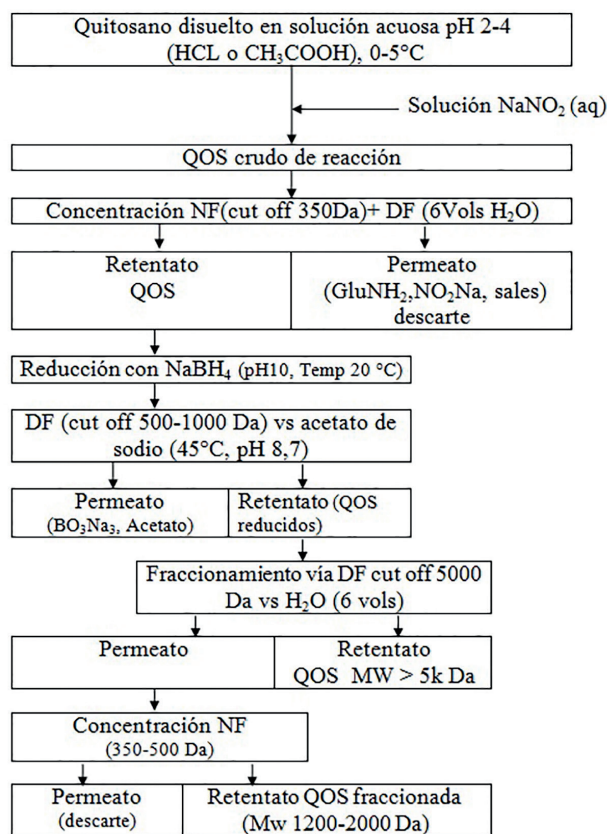
Por suave calefacción, a 40-45°C, el color rosado franco reaparece, lo cual marca la temperatura de reversibilidad del complejo bórico-carbohidrato (pH 8,7-8,9). Si se enfría a 25°C, el tono rosado desaparece, lo cual indica la nueva formación del complejo bórico (aunque el valor de pH permanece sin cambios) (48); este ensayo constituye la base de la eliminación del boro residual en carbohidratos reducidos con  $\text{NaH}_4\text{B}$ .

En efecto, disolviendo el compuesto poliólico que contiene boro como éster en solución acuosa de acetato sódico, por ejemplo, 0,2 M a pH 8,7-8,9 y calentando a 40-45°C, se tendrá el complejo bórico disociado (tal como se vio en la Figura 3.5). Si esta solución, entonces, se somete a diafiltración (cut off 500-1000 Da) versus acetato sódico 0,2 M (pH 8,7-8,9) a 40-45°C permeando varios volúmenes de diafiltrante, el boro estará presente en los permeatos como  $\text{Na}_3\text{BO}_3$  y el polisacárido quedará retenido en el retentato, del cual se recupera por ajuste de pH (6,0-6,5) y posterior precipitación con alcohol. Este aspecto debe tenerse en cuenta, ya que un exceso de Boro resulta perjudicial para los vegetales. El técnico actuante y el experto agrónomo son quienes decidirán si el proceso de eliminación del Boro residual se justifica o no. No sin razón, se ha afirmado que la producción eficiente de quitoooligosacarinas a escala técnica cons-

tituye una empresa desafiante (49). De manera que, como queda expuesto, puede lograrse una eficiente purificación y fraccionamiento de la quitoooligoscarina “cruda” a través de la implementación ingeniosa de criterios de ultrafiltración, diafiltración y nanofiltración (50).

La Figura 3.6 pretende sugerir un método tentativo y no excluyente de obtención de quitoooligosacáridos (QOS) implementando modernas tecnologías de separación y purificación por membranas.

Figura 3.6 Producción de quitoooligosacarinas por depolimerización con  $\text{HNO}_2$ : método tentativo



QOS=Quitoooligosacarinas; NF= nanofiltración;  
DF= Diafiltración ; GluNH<sub>2</sub>=Glucosamina (monómero o dímero)

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (44) (46) (47) (48) (50)

Del examen de la Figura 3.6 se hace evidente que el peso molecular promedio del “QOS crudo de reacción” debe estar ajustado en sus valores adecuados para que la posterior secuencia de pasos de fraccionamiento y purificación, rinda una fracción de QOS final de pesos moleculares y distribución molecular conforme a lo requerido. Independientemente del ajuste de las condiciones experimentales en el laboratorio (establecimiento de la cinética de la reacción, determinación del orden de reacción, etc.), el seguimiento de la reacción de depolimerización (“rastreo” de la reacción) debe hacerse cuando la misma se practique a toda escala, incluida la escala técnica. Esto se debe a que el quitosano de partida es de procedencia industrial y por tanto con una distribución de grupos N-acetilo y grado de acetilación poco menos que azaroso: dado que la acción del ácido nitroso se expresa sobre el grupo amino libre y no sobre el grupo acetilamino, resulta claro que la depolimerización ocurrirá sobre los centros de glucosamina libre y no sobre las unidades acetilglucosamínicas, con una ocurrencia similar al patrón de acetilación del material de partida.

De manera que en el proceso técnico será necesaria una forma rápida de control del proceso de depolimerización para poder detenerlo de inmediato cuando se llegue al valor de pesos moleculares deseados del polisacárido en el seno de la reacción.

Es prudente, por tanto, elegir un método sencillo y ágil, capaz de ser efectuado rápidamente en el curso de 1-2 minutos para obtener el valor aproximado del peso molecular instantáneo en ese momento del proceso. Esto no puede hacerse por medidas de HPSEC, pues no es suficientemente



ágil y porque no puede inyectarse a la columna del cromatógrafo la solución en reacción tal cual.

Un método sencillo y rápido que ha dado excelentes resultados en manos del presente autor es practicar el dosaje de nitritos en el seno de la reacción a través de una volumetría de oxidación-reducción, empleando como agente titulante una solución valorada de cloramina-T.

El dosaje de nitritos en medio ácido por reacción con cloramina-T es un método bien conocido en Química Analítica Cuantitativa, empleado desde el año 1924 (51) y que se adapta perfectamente a los fines prácticos.

La cloramina-T (N-cloro p-toluenosulfonamida sal sódica trihidrato, peso molecular 281,7) es un subproducto de la fabricación de sacarina y se puede obtener en el comercio en forma muy pura, de calidad para análisis. Su solución acuosa reacciona oxidimétricamente como si fuera un hipoclorito, aunque resulta mucho más estable que el mismo en solución acuosa. Reacciona con KI en medio ácido liberando I<sub>2</sub> en forma equivalente, el cual puede ser, a su vez, contratitulado con solución valorada de tiosulfato.

Una solución acuosa 0,05 N de cloramina-T se prepara disolviendo en agua destilada, aproximadamente 7,25 g del producto puro y aforando a 1 litro de solución; se valora adecuada y sencillamente en la forma usual haciendo reaccionar un volumen medido de la solución a valorar con exceso de KI en medio ácido y contratitulando el I<sub>2</sub> equivalente liberado, con solución valorada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (51). Se propone la preparación y normalización de una solución 0,05 N de cloramina-T, porque una concentración apropiada de nitrito inicial (o mejor dicho, de HNO<sub>2</sub> expresado como NaNO<sub>2</sub>)

es 0,05 N. Pero resulta evidente que el método es aplicable a cualquier concentración estimada que se desee o que indique la experiencia.

El autor de esta contribución ha practicado el método con resultados muy satisfactorios, tal como se lo detalla a continuación (52).

Sobre la solución acuosa de quitosano a depolimerizar (5-10% p/V) previamente ajustada a pH 2,5 con HCl concentrado y enfriado entre 0 y 5°C, se agrega  $\text{NaNO}_2$  en cantidad suficiente para lograr una concentración de aproximadamente 0,05 M. Dado que este es el  $t_0$  de la reacción, se toma 1 ml de solución en reacción y se descarga en un frasco cónico con tapa (matraz “pollerita”) sobre 50 cm<sup>3</sup> de la solución valorada de cloramina-T, acidificando con ácido acético diluido (3M). Luego de 2 minutos, se agrega exceso de solución de KI y se contratitula el yodo liberado con solución valorada de tiosulfato de sodio, frente al reactivo de almidón como indicador (se pueden encontrar más detalles experimentales en (51)). A cada instante prefijado, se toma muestra de reacción y se practica el dosaje de nitrito residual. La correlación de los valores de tiempo de reacción versus concentración de nitrito y peso molecular del sustrato (HPSEC) se logra tomando doble muestra de la mezcla en reacción, la primera de ellas para la volumetría y la segunda para la obtención de unos cg de polisacárido, precipitando a totalidad con exceso de etanol: el polisacárido se examina luego por HPSEC para obtener los valores correspondientes a  $\overline{M}_w$  y  $M_n$ .

Se obtendrá entonces una correlación aceptable (por la adecuada repetición del proceso en escala de laboratorio)

entre la concentración actual de nitrito y el peso molecular del productos de reacción correspondiente a ese valor de tiempo en particular. Examinando suficientes muestras de quitosano de diferentes proveedores, se obtendrá una tabulación verdaderamente aceptable para todo fin técnico.

### **3.2.1.2 Depolimerización de quitosano en medio ácido**

En la práctica fabril, el quitosano se depolimeriza en medio ácido utilizando HCl concentrado (12 M) o más diluido, como por ejemplo, 6 M. La agresividad de los reactivos utilizados y los materiales con los que deben construirse las instalaciones son la principal limitación al método, conjuntamente con la dificultad (y el costo) de la eliminación del medio ácido tan concentrado. Otra dificultad importante es la coloración que adquiere el oligosacárido resultante, coloración ésta francamente indeseable y debida a reordenamientos del tipo de Lobry de Bruyn-van Ekenstein y reacciones parásitas de pardeamiento, difíciles de eliminar del producto final.

Cabrera y Van Cutsem (53) obtienen quitoooligosacáridos de grado de polimerización mayor a 6 por hidrólisis del quitosano en HCl 12 M (30 minutos a 72°C) y posterior fraccionamiento de la mezcla de reacción a concentraciones variables de metanol, obteniendo quitoooligómeros casi totalmente deacetilados.

Aunque la hidrólisis ácida también se ha practicado en el seno de ácido acético acuoso 0,5 M (54), el método de elección parece ser el tratamiento de polisacárido con soluciones clorhídricas concentradas o semidiluidas. El extenso

estudio de Cabrera y Van Cutsem (53) proporciona las bases para la obtención de QOS de diferente grado de depolimerización y de acetilación (DP y DA por sus siglas en inglés). QOS de bajo DP se obtienen por tratamiento ácido y de alto DP se obtiene por tratamiento enzimático (ver 3.2.1.3). La bioactividad está correlacionada con el patrón estructural característico del QOS en particular, es decir, el DP y el DA. Dada la diversidad estructural del quitosano de partida (ya citado en 3.2.1.1), estos autores proceden a la normalización de estos parámetros implementando una etapa de reacetilación del oligosacárido casi totalmente deacetilado, con diferentes cantidades de anhídrido acético en presencia de metanol como inhibidor de la indeseable reacción de O-acetilación (55).

Por cierto, la reacción de acetilación es bien conocida y aplicable a otros polisacáridos y susceptible de ser practicada a escala industrial (56). Se obtienen así QOS con diferentes patrones de acetilación para un mismo grado de polimerización, lo que permite ajustar adecuadamente su bioactividad correspondiente. Recientemente se ha dado a conocer un extenso documento (56) que sienta las bases para la solución técnica de los inconvenientes citados de la hidrólisis ácida del quitosano, es decir, fuertes concentraciones de HCl, bajos rendimientos del oligómero obtenido y extensas (y no siempre fructuosas) etapas de purificación para eliminar compuestos coloreados de la quitoooligosacarina final. Ibrahim y colaboradores (57) utilizan provechosamente zeolitas como adsorbente en el seno de la reacción ácida con objeto de “direccionar” adecuadamente el proceso hidrolítico, minimizar reacciones parásitas, operar con me-

nores concentraciones de ácido y elevar los rendimientos. Estos investigadores ensayan y caracterizan multiplicidad de muestras de zeolitas con tal finalidad y descubren que el tipo de zeolita no afecta fundamentalmente el quitosano oligomérico producido y presentan un modelo de reacción por adsorción del polisacárido en la superficie y no en el interior del poro de la partícula de zeolita (57). Ello permite operar con soluciones de concentración clorhídrica aceptable (1,8 M). Adicionalmente, se presenta un interesante método analítico, sencillo y práctico para su ejecución en trabajos a toda escala para el seguimiento fotométrico de la aparición de los respectivos QOS.

### **3.2.1.3 Hidrólisis enzimática del quitosano**

Los procesos de hidrólisis enzimática de quitosanos para producir quitoooligosacáridos son conocidos e instrumentados industrialmente por lo menos desde la década de 1980-1990 (58). Estos procesos industriales se ven favorecidos por el hecho de que el quitosano es hidrolizado por enzimas inespecíficas, tales como algunas proteasas, alfa-amilasas, celulasas y algunas pectinasas (53). El grupo del Prof. J.C. Cabrera (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA, Cuba), pionero en la investigación sobre oligosacarinas (53), obtuvo quitoooligosacarinas por hidrólisis enzimática del quitosano utilizando pectinasas comerciales (Pectinex Ultra Spl®, Novozymes, Dinamarca), habiendo proporcionado quitoooligómeros de mayor grado de acetilación que los que provee la hidrólisis ácida.

Estos trabajos permiten obtener quitoooligosacarinas con distinto patrón de acetilación a igualdad de pesos molecula-

res: aparentemente, la citada pectinasa tiene puntos de ataque sobre la cadena del quitosano, estrechamente relacionados con la presencia del resto N-acetilglucosamina.

Se han efectuado extensos estudios sobre la actividad de distintos tipos de enzimas comerciales dada la versatilidad y la suavidad de los procesos enzimáticos.

Roncal y colaboradores (59) han producido QOS por acción de la pepsina sobre un quitosano altamente deacetilado, con altos rendimientos y nula liberación de glucosamina libre y también se ha ensayado el uso de lisozima sobre el quitosano con los mismos fines (60). El costo de las quitosanasas ha impedido a la fecha su uso industrial, pero en su reemplazo se han usado otras enzimas inespecíficas disponibles en el comercio, tal como las ya citadas (61).

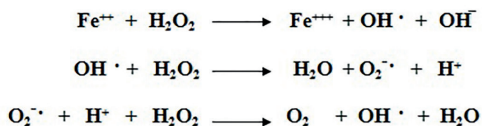
#### **3.2.1.4 Depolimerización oxido-reductiva del quitosano**

En el año 1876, H.J.H. Fenton (62) describe la reacción de oxidación que presenta el ácido tartárico con el peróxido de hidrógeno, en presencia de sales ferrosas y determina que el producto de reacción es el ácido dihidroximaleico (63).

IUPAC (64) define la Reacción de Fenton como la “descomposición del peróxido de hidrógeno, dependiente de sales de hierro, lo que genera el radical hidroxilo altamente reactivo, posiblemente vía un intermediario de oxohierro (IV)”.

La Figura 3.7 presenta las ecuaciones generalmente aceptadas para esta descomposición, con la aparición del extremadamente reactivo y oxidante radical hidroxilo,  $\text{OH}\cdot$ .

Figura 3.7 Reacción de Fenton y contribución de Haber-Wilstäter



**Referencias:** (64) (65) (66) (67)

El cobre, el cobalto y, en general, los elementos de transición, también catalizan la reacción de Fenton.

La reacción de Fenton ha revelado ser sumamente versátil para la degradación oxido-reductiva de carbohidratos (incluidos polisacáridos de diferentes tipos) y el quitosano no es una excepción al respecto.

Yin y colaboradores (68) han desarrollado un inteligente procedimiento para la obtención de quitoooligosacáridos, basado en la depolimerización del quitosano con  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizada por sales cúpricas.

Aunque dichos investigadores no han empleado el método para la obtención de los productos citados con fines agrícolas, el proceso se adapta perfectamente por su agilidad, sencillez y elegancia.

Básicamente, el quitosano inicial disuelto en agua se hace reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de  $\text{Cu}^{++}$  como catalizador Fenton: según las condiciones de reacción, se obtienen QOS de pesos moleculares distintos y con amplia variedad de distribuciones moleculares. El  $\text{Cu}^{++}$  utilizado como catalizador (puede ser reemplazado por  $\text{Fe}^{++}$ ) resulta coordi-

nado preferentemente por los grupos amino y acetilamino expuestos por el polisacárido.

El método presenta enormes posibilidades técnicas debido a la gran variedad de condiciones que pueden ser aplicadas (concentración de sustrato, catalizador y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , temperatura, tiempo, atmósfera bajo la cual se realiza la reacción, etc.). Puede suceder que en algunos casos, la adición de  $\text{Fe}^{++}$  no sea necesaria para la catálisis de la reacción, puesto que este metal es una impureza común en el quitosano comercial (69). Multiplicidad de condiciones de reacción para los procesos Fenton (y para todo tipo de reacciones de degradación de quitosanos) han sido expuestas por Mourya y col. (69) en un documento de lectura obligada. Otros oxidantes también han sido utilizados para la degradación oxidativa del quitosano, por ejemplo, persulfato de sodio o de potasio (69), pero en la práctica industrial se prefiere el uso del sistema de  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{++}$  por su modulabilidad y simplicidad. El peryodato de potasio fue ensayado con éxito para la degradación de quitosano debido a su capacidad de actuar como reactivo “rompedor” de  $\alpha$ -glicoles y de  $\alpha$ -aminoalcoholes (70). Debido a la indeseable aparición de grupos aldehído, habitualmente a la primera reacción le sigue una etapa de reducción con borohidruro sódico seguido de una hidrólisis ácida, con lo cual tiene lugar, entonces, un proceso en tres etapas conocido como “reacción de Smith” (71).

Los oligómeros de quitosanos obtenidos así han dado excelentes resultados en su aplicación en Horticultura (70), pero la producción a escala industrial acorde con este método no parece sencilla debido al costo de los reactivos utilizados y a los pasos obligados de purificación.



En la práctica técnica, en los procesos Fenton aplicados a la producción de QOS, la reacción en curso puede ser fácilmente seguida por dosaje a cada instante prefijado del tenor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual.

Dado que la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en todo instante se relaciona con el peso molecular promedio del polisacárido en proceso de depolimerización, es sencilla la vinculación del contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la solución a todo tiempo “t” con el peso molecular promedio para cada calidad y tipo de quitosano de partida.

Obviamente, alteraciones en la estructura molecular del polisacárido (grado de acetilación, peso molecular) ocasionarán cambios importantes en la velocidad de reacción, habitualmente de I orden, por lo que las calidades del polisacárido de partida deben ser estudiadas y, en lo posible, ser constantes. En todo caso, el rastreo instantáneo de la evolución de la reacción a escala de fábrica es lo indicado. Si la reacción es de I orden, entonces el proceso estará gobernado por las siguientes expresiones, tal como lo indica la Figura 3.8, a saber:

**Figura 3.8: Depolimerización de quitosano  
vía Fenton: orden de reacción**

$$C_t = C_o e^{-kt} \quad (1)$$

$$\ln C_t = \ln C_o - kt \quad (2)$$

$$kt = \ln C_o - \ln C_t \quad (3)$$

$$t = \frac{1}{k} \ln C_o - \frac{1}{k} \ln C_t \quad (4)$$

pero  $\frac{1}{k} \ln C_o = \text{constante} = a$

y  $\frac{1}{k} = \text{constante} = b$

reemplazando en (4) :

$$t = a - b \ln C_t \quad (5)$$

por lo que resulta evidente que el tiempo de reacción “t” sigue una función lineal de  $\ln C_t$ .

$C_t$  : molaridad de  $H_2O_2$  a cierto instante “t”

$C_o$  : molaridad de  $H_2O_2$  al origen de la reacción

k : velocidad específica de reacción (constante de velocidad)

t : tiempo de reacción

Referencias: (68) (72).

Si aceptamos esto (tan solo como aproximación, pues las reacciones radicalarias son, en rigor, de órdenes de reacción más complejos), entonces el procedimiento de “rastreo” de la reacción y la elección del instante en el cual detenerla para lograr el peso molecular promedio sería como sigue:

- Se practica la reacción en laboratorio sobre variedad de muestras de quitosano comercial, dosando  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual a cada instante prefijado, tomando en el mismo instante muestra de reacción que se precipita a totalidad con alcohol, se seca y se somete a examen HPSEC para conocer su peso molecular promedio y su distribución molecular.
- Dado que a cada instante “t” corresponde un tenor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual y el mismo está vinculado a un valor de  $\overline{\text{Mw}}$ , entonces la ecuación (5) nos indica que el gráfico de t en función de “ln  $\overline{\text{Mw}}$ ” también será lineal.
- La construcción de los citados gráficos para distintas calidades de quitosano inicial y diferentes condiciones de reacción permitirá detener la misma en cualquier momento prefijado para obtener un QOS “crudo de reacción” con el valor de  $\overline{\text{Mw}}$  esperado.
- La valoración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual a cada instante “t” puede hacerse sencilla y elegantemente por métodos yodométricos haciendo reaccionar la muestra que contiene  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual con exceso de KI en medio sulfúrico diluido y titulando el  $\text{I}_2$  equivalente liberado con solución valorada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (la reacción necesita ser catalizada con gotas de solución diluida de molibdato de sodio para que la interacción entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el yoduro sea instantánea) (73).

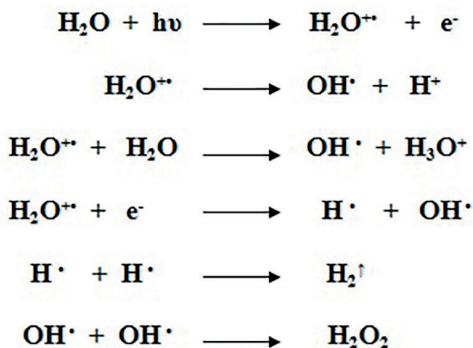
Mourya y colaboradores (69) detallan que la reacción radicalaria de depolimerización con  $\text{H}_2\text{O}_2$  resulta estimulada por la irradiación del sistema con luz UV o con rayos  $\gamma$ , dado que ambos agentes son “per se” disociantes de la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con generación del muy reactivo radical hidroxilo.

### 3.2.1.5 Depolimerización del quitosano por irradiación $\gamma$

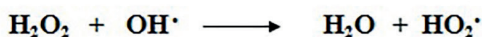
Cuando el agua pura se irradia con rayos X,  $\gamma$  o haces electrónicos de alta energía, se obtienen especies radicalarias muy reactivas (que incluyen el radical hidroxilo) y también estructuras no radicalarias, tales como el peróxido de hidrógeno e incluso hidrógeno molecular.

La escisión de la molécula de agua a través de fotones de alta energía es lo que se conoce con la denominación de radiólisis del agua (74). En principio, el impacto de la radiación ionizante con la molécula de agua origina una serie de reacciones en cadena que se representan en la Figura 3.9.

Figura 3.9: Radiólisis del agua pura



El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido reacciona a su vez con las radicales reactivos (tal como el  $\text{OH}^\bullet$ )



Referencia: (74)

En todo caso, la formación de radicales oxigenados fuertemente reactivos, tal como el ya citado  $\text{HO}^\cdot$  reaccionan instantáneamente con el polisacárido en solución acuosa cuando ésta se somete a radiación de alta energía, fundamentalmente radiación  $\gamma$ , generando la depolimerización del polímero. Independientemente o en adición a las reacciones generadas por la radiólisis del agua sobre el sustrato en solución (efecto indirecto), la radiación ionizante, al impactar sobre la molécula del macrosoluto, también origina efectos depolimerizantes de origen radicalario.

Ambos efectos colaboran para la degradación radiolítica del polisacárido (74). El método es de aplicación general a una variedad de polisacáridos, no solamente quitosanos; por ejemplo, se ha aplicado a la obtención de oligosacáridos de heparina (heparinas de bajo peso molecular) con excelentes resultados (75) (76).

Los procesos de depolimerización que emplean radiación  $\gamma$  son elegantes y compatibles con el medio ambiente y generan productos fáciles de purificar, ya que prácticamente están libres de subproductos de reacción. Sin embargo, se debe llevar a cabo una afinación a escala máxima en unidades especializadas que operen con radiación atómica. Debe tenerse en cuenta que un exceso de radiación genera productos coloreados (indicadores de alteraciones estructurales indeseables sobre la cadena del oligosacárido) con aparición concomitante de grupos carboxílicos y cetónicos (69) y, en general, los ya citados reordenamientos de Lobry de Bruyn-van Ekenstein (procesos de caramelización). De aquí que resulta obvio que el proceso radiodepolimerizante debe ajustarse a la perfección: las cadenas de

menor peso molecular bioactivas por excelencia resultan siempre las más afectadas por alteraciones estructurales concomitantes.

Lo mismo sucede en los procesos oxido-reductivos, no solo aplicados a la obtención de QOS, sino prácticamente a todo polisacárido que se someta a este tipo de reacciones. El incremento de la agresión estructural con el descenso del peso molecular medio puede ser seguido a través de las medidas de absorbancia (efectuadas por espectrofotometría UV) de la solución acuosa de cada fracción oligosacáridica, lo que pone de manifiesto la aparición de dobles ligaduras (olefinización del carbohidrato) y otros grupos químicos opacos en el rango ultravioleta del espectro (77).

Si cada fracción es poco dispersa, se puede calcular un coeficiente de extinción molar medio ( $\epsilon_m$ ): su graficación versus el  $\overline{M}_w$  (obtenido por HPSEC) brindará información interesante (y muy aplicable en el campo técnico) sobre la aparición de reacciones secundarias indeseables cuando el proceso se conduzca en condiciones sub-óptimas (77). Las condiciones determinantes de la cinética compleja que siguen los procesos de depolimerización radiolítica (y los de degradación oxido-reductiva) son las siguientes:

- Concentración del polisacárido en la solución acuosa inicial.
- Intensidad de la radiación  $\gamma$  y dosis de radiación.
- Irradiación constante o administración en forma pulsátil.
- pH de la solución acuosa.
- Impurezas metálicas (Fe, Cu) en el polisacárido de par-

tida: es común que el quitosano esté “contaminado” con trazas de hierro (catalizador Fenton).

- Diferentes grados de acetilación del quitosano y/o diferentes microheterogeneidades sobre la cadena del polisacárido a depolimerizar. Las mismas pueden ser generadas naturalmente o por los métodos de obtención de los polisacáridos.

Los estudios sobre depolimerización radiolítica de polisacáridos y sobre quitosanos en el caso que se está tratando son excelentes y muy variados.

El autor ha pretendido referenciar aquellos que a su parecer poseen interesantes posibilidades tecnológicas en lo referente a su práctica fabril.

Choi y colaboradores (78) preparan quitoooligómeros por irradiación  $\gamma$  (Co-60) de quitosanos disueltos al 2% en solución 2% de ácido acético. La solución fue sometida a diferentes intensidades de radiación.

Estos investigadores comprueban la aparición de alteraciones estructurales espurias, conforme aumenta la intensidad de radiación, resultando un producto fuertemente pardeado por sobre una intensidad de 100 kGy: se comprueba en estos casos la generación de dobles ligaduras como resultado de esta exposición exagerada (78), obteniéndose, por otra parte, una interesante fracción oligomérica con abundancia de oligosacáridos con un grado de polimerización comprendido entre 2 y 6 hexasacáridos (78).

Independientemente del uso de radiación como único agente depolimerizante, el empleo concomitante de activadores de la radiólisis del agua está siendo cada vez más

considerado: aparentemente, los rendimientos en la fracción oligosacáridica deseada son mejores y la reacción se conduce más eficientemente.

Al respecto, Du et al (79) ensayan la degradación de quitosano bajo forma de pasta por humedecimiento con  $H_2O_2$  de distinta concentración, irradiando con rayos  $\gamma$ . Con ello, logran mayor efectividad en la reacción y producen mejores rendimientos, aún empleando bajos niveles de radiación (<20 kGy).

El sensibilizador más utilizado es  $H_2O_2$ , por su bajo costo y ausencia de sub-productos de reacción. Sin embargo, otros oxidantes pueden ser usados con éxito, a condición de eliminar luego sales inorgánicas residuales de la reacción fundamental. Así, El-Sawy y colaboradores (80) ensayan persulfato de amonio y  $H_2O_2$  como sensibilizadores de reacción, obteniendo resultados muy promisorios.

Esta línea de trabajo había sido ensayada exitosamente en forma previa por Yoksan et al (81) en el año 2004, quienes publican la promoción de la reacción de radiólisis por empleo de persulfato potásico y  $H_2O_2$ , habiendo logrado quitooligosacáridos que retienen la misma estructura molecular que el quitosano de partida sin microalteraciones producidas sobre la cadena del polisacárido. Para ello, estudian y optimizan la reacción de degradación en forma sumamente elegante.

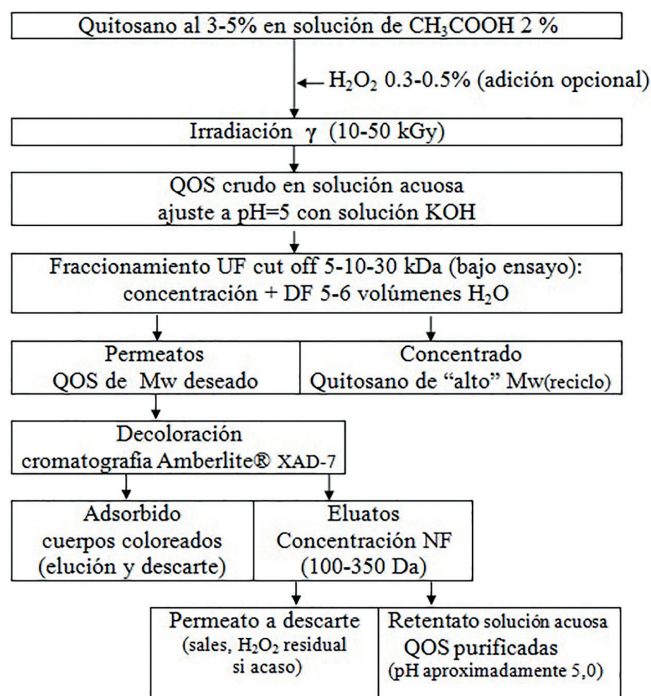
En un estudio notable, Hien, N.Q. (82) estudia la reacción de depolimerización de quitosanos de diferente grado de deacetilación y evalúa la cinética del proceso con irradiación  $\gamma$  sin promotor, con  $H_2O_2$  sin radiación y con ambos agentes en proporciones variables, demostrando la efectividad del par  $H_2O_2$  – radiación  $\gamma$ .



También se ha estudiado en forma muy conveniente el fraccionamiento por ultrafiltración (UF) con distintos pesos moleculares de corte, del QOS “crudo” de reacción obtenido por procesos radiolíticos (83): se preparan así fracciones oligoméricas de peso molecular medio inferior a 10 kDa, 10-30, 30-50, 100-300 y de peso molecular superior a 300 kDa.

Para finalizar, el autor desea dirigir al lector al estudio profundo de bibliografía publicada por la International Atomic Energy Agency (IAEA) (84), material sumamente autorizado sobre los procesos radiolíticos en polisacáridos destinados a aplicaciones agrícolas, en donde se detallan las tecnologías utilizadas y la aplicación de las oligosacarinas obtenidas a distintas especies vegetales con los resultados logrados.

Figura 3.10 Producción de quitoooligosacarinas por depolimerización con radiación  $\gamma$ : método tentativo



QOS=Quitoooligosacarinas; NF= Nanofiltración; DF= Diafiltración

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84)

Del examen de la Figura 3.10 resulta que el peso molecular promedio del QOS “crudo” obtenido por irradiación  $\gamma$  debe encontrarse en sus valores ajustados para el posterior fraccionamiento por UF en orden a obtener un producto final purificado, con las especificaciones requeridas y con

rendimientos comercialmente aceptable. El ensayo en laboratorio de las distintas condiciones de reacción, así como la verificación del peso molecular de corte de la membrana de UF resulta fundamental. El cut off de las diversas membranas ensayadas originará diversas calidades y rendimientos de los QOS finales, en base a lo cual se decidirá por el cut off más indicado. Para ello, también es obligado el ensayo agronómico de aptitud en macetas, de forma de orientar las características de peso molecular y distribución molecular con mayor bioactividad. Con esta información, se procederá a efectuar lotes a escala de banco a fin de comprobar la repetibilidad de los niveles de bioactividad antes de pasar a escala piloto.

También se debería ensayar la naturaleza del material con el cual está construido el reactor y la influencia de su geometría en el curso del proceso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) El-Tarabily, K.A.; Sivasithamparam, K. (2006). "Potential of yeast as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters". *Mycoscience* 47(1): 25-35. doi: 10.1007/s10267-005-0268-2.  
[https://www.researchgate.net/profile/Khaled\\_El-Tarabily/publication/227222888\\_Potential\\_of\\_yeasts\\_as\\_biocontrol\\_agent\\_of\\_soil-borne\\_fungal\\_plant\\_pathogens\\_and\\_as\\_plant\\_growth\\_promoters/links/56b8e1db08ae35670495bc53/Potential-of-yeasts-as-biocontrol-agent-of-soil-borne-fungal-plant-pathogens-and-as-plant-growth-promoters.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Khaled_El-Tarabily/publication/227222888_Potential_of_yeasts_as_biocontrol_agent_of_soil-borne_fungal_plant_pathogens_and_as_plant_growth_promoters/links/56b8e1db08ae35670495bc53/Potential-of-yeasts-as-biocontrol-agent-of-soil-borne-fungal-plant-pathogens-and-as-plant-growth-promoters.pdf).
- 2) Tsai, P-K.; Frevert, J.; Ballou, C.E. (1984). "Carbohydrate structure of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9 Mannoprotein". *JBC* 259(6): 3805-3811 (downloaded from [www.jbc.org](http://www.jbc.org)). <http://www.jbc.org/content/259/6/3805.full.pdf+html>.
- 3) Huang, G.L (2008). "Extraction of two active polysaccharides from the yeast cell wall". *Z. Naturforsch.* 63c: 919-921.  
<http://www.znaturforsch.com/s63c/s63c0919.pdf>.
- 4) Ivković, M.; Perić, L.; Cvetković, D.; Glamović, D.; Spring, P. (2012). "Effects of a novel carbohydrate fraction on broiler performance and intestinal function". *South African J. Anim. Sci.* 42(2): 131-138. doi: 10.4314/sajas.v42i2.5.  
<https://www.ajol.info/index.php/sajas/article/viewFile/80171/70431>.
- 5) Kwiatowsky, S.; Kwiatowsky, S.E. (2012). "Yeast (*Sa-*

*ccharomyces cerevisiae*) glucan polysaccharides – Occurrence, separation and application in food, feed and health industries” in “The Complex World of Polysaccharides” (Intech Open): no pages.

doi: 10.5772/48100.

<https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40576.pdf>.

- 6) Bayarjargal, M.; Munkhbat, E.; Ariunsaikhan, T.; Odonchimeg, M.; Uurzaikh, T. and others (2011). “Utilization of spent brewer’s yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the production of yeast enzymatic hydrolysate”. Mongolian J. Chem. 12(38): 88-91.  
[https://www.researchgate.net/profile/D\\_Regdel/publication/286757813\\_Utilization\\_of\\_spent\\_brewer%27s\\_yeast\\_Saccharomyces\\_cerevisiae\\_for\\_the\\_production\\_of\\_yeast\\_enzymatic\\_hydrolysate/links/56a85bce08ae0fd8b3fe4a95/Utilization-of-spent-brewers-yeast-Saccharomyces-cerevisiae-for-the-production-of-yeast-enzymatic-hydrolysate.pdf](https://www.researchgate.net/profile/D_Regdel/publication/286757813_Utilization_of_spent_brewer%27s_yeast_Saccharomyces_cerevisiae_for_the_production_of_yeast_enzymatic_hydrolysate/links/56a85bce08ae0fd8b3fe4a95/Utilization-of-spent-brewers-yeast-Saccharomyces-cerevisiae-for-the-production-of-yeast-enzymatic-hydrolysate.pdf).
- 7) Castañón González, M.J. (2009). “Efecto de la adición de hidrolizados de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la obtención de leches acidificadas”. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos (Univ. de Chile, Fac. Cs. Quím. y Farmac.)  
[http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-castanon\\_mj/pdfAmont/qf-castanon\\_mj.pdf](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-castanon_mj/pdfAmont/qf-castanon_mj.pdf).
- 8) Díaz, V.B. (2016). “Conversión técnica de proteínas – Valorización de desechos proteicos” (AMV Ediciones, Madrid; [www.amvediciones.com](http://www.amvediciones.com). I edición): 45-70.
- 9) Díaz, V.B. (1981). Observaciones personales del autor.

- 10) Tanguler, H.; Erten, H. (2008). "Utilization of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: the effect of temperature". *Food and Bioproducts Processing* 86(4): 317-321.  
doi: 10.1016/j.fbp.2007.10.015.  
[http://immaculatebrewery.com/content/images/sciencepapers/Utilisation%20of%20spent%20brewers%20yeast%20for%20teast%20extract%20production%20by%20autolysis\\_the%20effect%20of%20temperature.pdf](http://immaculatebrewery.com/content/images/sciencepapers/Utilisation%20of%20spent%20brewers%20yeast%20for%20teast%20extract%20production%20by%20autolysis_the%20effect%20of%20temperature.pdf).
- 11) Harada, S.; Itoh, J.; Yano, M.; Aoyagi, Y.; Maekawa, H. (1989). "Procedimiento para preparar un extracto de levadura". Patente española 2007241.
- 12) Kado, H.; Shibata, T.; Kobayashi, F.; Kubota, M. (2000). "Process for producing yeast extract". U.S. Patent 6051212.
- 13) Díaz, V.B. (2016). op. cit.: 16-44.
- 14) AgBioTech Inc. "Vitazyme in various crops in Latin America and the Caribbean".  
[www.agbioinc.com](http://www.agbioinc.com) (New York, USA).
- 15) Parrado Rubio, J. (2013). "Procedimiento para obtener biofertilizantes y bioestimulantes para agricultura y alimentación animal". World Patent application WO 2013030422 A1 (also published as Eur. Pat. 2752399 B1).
- 16) Pujos, P. (2013). "Protection of plants against their pathogenic agents". U.S. Patent 8609084 B2.
- 17) Novo Nordisk Ferment (hoy, Novozymes). Glucanex® (1991). B445b-E2500.
- 18) Kim, K.S.; Chang, J.E.; Yung, H.S. (2004). "Estimation of soluble  $\gamma$ -glucan content of yeast cell by the sensi-

- vity to Glucanex® 200G treatment”. *Enzyme and Microbial Technol.* 35(6, 7): 672-677.  
doi: 10.1016/j.enzmictec.2004.08.020.
- 19) Varelas, V.; Tataridis, P.; Liouni, M.; Nerantzis, E.T. (no date). “Application of different methods for the extraction of yeast  $\gamma$ -glucan”. *E-Journal Sci. Technol. (e-JST)*: 75-89.  
[http://e-jst.teiath.gr/issue\\_44/Varelas\\_44.pdf](http://e-jst.teiath.gr/issue_44/Varelas_44.pdf).
- 20) Hough, J.S. (1990). “Biotecnología de la cerveza y de la malta”. (I Edición, Edit. Acribia, Zaragoza, ISBN 84 200 06815).
- 21) Johansson, L. (2006). “Structural analyses of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)-D-glucan of oats and barley” (dissertation). EKT series 1354, Univ. Helsinki, Dept. of Appl. Chem. and Microbiol. 85 pp.  
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.407.4816&rep=rep1&type=pdf>.
- 22) Amelinckx, A. (2015). “Beer: waste not, want not: 5 ways breweries recycle their waste”. <https://modernfarmer.com/2015/08/recycled-brewery-waste/>.
- 23) Witkiewicz, K. (2012). “Sustainable uses of spent grain”. <https://www.craftbeer.com/craft-beer-muses/sustainable-uses-of-spent-grain>.
- 24) Zebell, L.; Deming, E.; Heitland, J. (2016). “Spent grain: creative waste solutions”. [www.gibbs-lab.com/foodwaste](http://www.gibbs-lab.com/foodwaste).
- 25) Mussatto, S.I. (2014). “Brewer’s spent grain: a valuable feedstock for industrial applications”. *J. Sci. Food Agric.* 94: 1264-1275.  
doi: 10.1002/jsfa.6486.

- [https://repositorium.sdum.uminho.pt/bits-tream/1822/31486/1/document\\_17746\\_1.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bits-tream/1822/31486/1/document_17746_1.pdf).
- 26) “La cerveza imposible de Nigeria” (1995). *Biotimes* (Novo Nordisk) 2: 12-13.
- 27) dos Santos Mathis, T.R.; Moretzhon de Mello, P.P.; Camporese Sérvulo, E.F. (2014). “Solid wastes in brewing process: a review”. *J. Brewing and Distilling* 5(1): 1-9 (Article number OE6313746212). doi: 10.5897/JBD2014.0043.  
[http://www.academicjournals.org/article/article1405623821\\_Mathias%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1405623821_Mathias%20et%20al.pdf).
- 28) Fărcas, A.C. (2014). “Research regarding the identification and exploitation of biologically active compounds from brewer’s spent grain by-product”. Ph.D. Thesis. Univ. of Agricultural Sci. and Vet. Medicine, Cluj-Napoca, Romania).  
<http://www.usamvcluj.ro/en/files/teze/en/2014/farcas.pdf>.
- 29) Fărcas, A.C.; Tofană, M.; Socaci, S.; Mudura, E. and others (2014). “Brewers spent grain – A new potential ingredient for functional foods”. *J. Agroaliment. Processes and Technol.* 20(2): 137-141.  
[http://journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/20623L21\\_Vol\\_20\(2\)\\_2014\\_137\\_141.pdf](http://journal-of-agroalimentary.ro/admin/articole/20623L21_Vol_20(2)_2014_137_141.pdf).
- 30) Reis, S.F.; Coelho, E.; Coimbra, M.A.; Abu-Ghannam, N. (2014). “Improved efficiency of brewer’s spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction”. *Ultrason. Sonochem.*  
doi: 10.1016/j.ultrasonch.2014.10.010.  
<https://arrow.dit.ie/cgi/viewcontent>.



- cgi?referer=http://scholar.google.com.  
ar/&httpsredir=1&article=1158&context=schfsehart.
- 31) Gencheva, P.; Dimitrov, D.; Dobrev, G.; Ivanova, V. (2012). "Hydrolysates from malt spent grain with potential application in the bioethanol production". *J. BioSci. Biotechnol.*, SE/ONLINE: 135-141.  
<http://www.jbb.uni-plovdiv.bg/documents/27807/178249/SE-2012-135-141.pdf/>.
  - 32) Sanzani, S.M.; Kamis, Y.; Nigro, F.; Ippolito, A. and others (2015). "Protein hydrolysates as resistance inducers for controlling green mould of citrus fruit". *Acta Horticulturae* 1065: 1593-1598.  
doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1065.203.  
[https://www.researchgate.net/profile/Antonio\\_Ippolito/publication/273457090\\_PROTEIN\\_HYDROLYSATES\\_AS\\_RESISTANCE\\_INDUCERS\\_FOR\\_CONTROLLING\\_GREEN\\_MOULD\\_OF\\_CITRUS\\_FRUIT/links/5504125b0cf231de0770544a.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Antonio_Ippolito/publication/273457090_PROTEIN_HYDROLYSATES_AS_RESISTANCE_INDUCERS_FOR_CONTROLLING_GREEN_MOULD_OF_CITRUS_FRUIT/links/5504125b0cf231de0770544a.pdf).
  - 33) Crosier, J.D. (2014). "Agricultural utilization of brewers' spent grain & sawdust: effects on fertility of soils and productivity of crops". Thesis for the degree of Master of Sciences (Ohio Univ.).  
[https://etd.ohiolink.edu/!etd.send\\_file?accession=ohiou1417788956&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=ohiou1417788956&disposition=inline).
  - 34) Saigne-Soulard, C.; Abdelli-Belhadj, A.; Téléf-Micouleau, M.; Bouscaut, J. and others (2015). "Oligosaccharides from *Botrytis cinerea* and elicitation of grapevine defense" in "Polysaccharides" (Ramawat, K.G.; Méri-

- llon, J-M., eds. Springer Int. Publ. SW): 939-958.  
doi: 10.1007/978-3-319-16298-0\_8.  
[https://www.researchgate.net/profile/Corio\\_Cos-tet\\_Marie-France/publication/299904780\\_Monito-ring\\_Resistance\\_in\\_Obligate\\_Pathogens\\_by\\_Bioassa-ys\\_Relating\\_to\\_Field\\_Use\\_Grapevine\\_Powdery\\_and\\_Downy\\_Mildews/links/571dc3ed08aee3ddc56acf84.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Corio_Cos-tet_Marie-France/publication/299904780_Monito-ring_Resistance_in_Obligate_Pathogens_by_Bioassa-ys_Relating_to_Field_Use_Grapevine_Powdery_and_Downy_Mildews/links/571dc3ed08aee3ddc56acf84.pdf).
- 35) Pintado, M.M.E. (2012). “Valorization of agriculture by-products: an integrated process”. 16th Edition of the Int. Soc. for Tropical Root Crops (24-27 Oct 2012).  
<http://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/10066/1/OI8.pdf>.
- 36) Rinaudo, M. (2006). “Chitin and chitosan: Properties and applications”. Prog. Polym. Sci. 31: 603-632.  
doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39627374/propiedades\\_del\\_quitosano.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510845131&Signature=TEIH7MrnrOzpkR8L4tO8ZkgRs0%-3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DPropiedades\\_del\\_quitosano.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39627374/propiedades_del_quitosano.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510845131&Signature=TEIH7MrnrOzpkR8L4tO8ZkgRs0%-3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DPropiedades_del_quitosano.pdf).
- 37) Kumirska, J.; Weinhold, M.X.; Thöming, J.; Stepnowsky, P. (2011). “Biomedical activity of chitin/chitosan based materials – Influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of N-acetylation”. Polymers 3: 1875-1901.  
doi: 10.3390/polym3041875.  
<http://www.mdpi.com/2073-4360/3/4/1875/htm>.

- 38) Anh Dzung, N. (2010). "Enhancing crop production with chitosan and its derivatives" in "Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and their Derivatives" (Se-Kwon Kim ed., CRC Press, ISBN: 978-1-4398-1603-5): 619-631. doi: 10.1201/EBK1439816035-c42.
- 39) Díaz, V.B. (2017). "Polisacáridos industriales de interés farmacéutico: Aislamiento, purificación, fraccionamiento" (I ed. AMV Ediciones, Madrid; ISBN 978-84-945166-6-5): 84-105.
- 40) Fieser, L.F.; Fieser, M. (1966). "Química Orgánica Superior" (Grijalbo S.A., Barcelona – México DF), I: 704-705.
- 41) Gutsche, C.D.; Pasto, D.J. (1979). "Fundamentos de Química Orgánica" (Reverté, Barcelona; ISBN 84-291-7475-3: obra completa). 2: 701-728.
- 42) Shively, J.E.; Conrad, H.E. (1970). "Stoichiometry of the nitrous acid deaminative cleavage of model amino sugar glycosides and glycosaminoglycuronans". *Biochemistry* 9: 33-43.
- 43) Shively, J.E.; Conrad, H.E. (1976). "Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin". *Biochemistry* 15: 3932-3942. doi: 10.1021/bi00663a005.
- 44) Nakao, E. (1994). "Chitin-chitosan oligomers having 2-5 anhydromannitol group or 2-5 anhydromannose group at terminal end and method of preparation thereof". U.S. Patent 5312908.
- 45) Lormeau, J.C.; Choay, J.; Petitou, M. (1981). "Oligosaccharide fractions and oligosaccharides with biological properties and their use as anticoagulants". *Europ. Pat. Application* 27089.

- 46) House, H.O. (1980). "Reacciones Modernas de Síntesis Orgánica" (Reverté, Barcelona; ISBN 84-291-7250-5): 24-25.
- 47) Gutsche, C.D.; Pasto, D.J. (1979). op.cit. 1: 262.
- 48) Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R. eds.; Longman Scientific and Technical, V Ed., ISBN 0-582-46236-3): 1224.  
<https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/Vespiary/talk/files/678-VogelPracticalOrganicChemistry5Thb074.pdf?topic=435.0>.
- 49) Das, S.N.; Madhuprakash, J.; Sarma, P.V.; Purushotham, P. and others (2015). "Biotechnological approaches for field applications of chitooligosaccharides (COS) to induce innate immunity in plants". Critical Reviews in Biotechnol. 35(1): 29-43.  
doi: 10.3109/07388551.2013.798255.
- 50) Dong, H.; Wang, Y.; Zhao, L.; Zhou, J.; Xia, Q. and others (2014). "Purification of DP 6 to 8 chitooligosaccharides by nanofiltration from the prepared chitooligosaccharides syrup". Bioresources and Bioprocessing 1: 20.  
[www.bioresourcesbioprocessing.com/content/1/1/20](http://www.bioresourcesbioprocessing.com/content/1/1/20).
- 51) Vogel, A.I. (1960). Química Analítica Cuantitativa (Edit. Kapelusz, Bs. As.). I: 521-523.  
<https://es.scribd.com/doc/87230874/Quimica-Analitica-Cuantitativa-Vogel>
- 52) Díaz, V.B. Observaciones personales del autor, no publicadas.
- 53) Cabrera, J.C.; Van Cutsem, P. (2005). "Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization

- higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan". *Biochem. Eng. J.* 25: 165-172 (downloaded from [www.elsevier.com/locate/bcej](http://www.elsevier.com/locate/bcej)).  
<https://pdfs.semanticscholar.org/d91b/215caf-8014b798124352a565dc070e8c8e43.pdf>.
- 54) Loayza, M.; Chávez, G.; Sabino, M. (2014). "Obtención y modificación química de oligosacáridos de quitosano". *Rev. Latinoam. Metal. Mat.* S6: 25-26.  
[https://www.researchgate.net/profile/Gerson\\_Chavez/publication/289191396\\_Collection\\_and\\_chemical\\_modification\\_of\\_chitosan\\_oligosaccharides/links/571ea64808aed056fa227223/Collection-and-chemical-modification-of-chitosan-oligosaccharides.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gerson_Chavez/publication/289191396_Collection_and_chemical_modification_of_chitosan_oligosaccharides/links/571ea64808aed056fa227223/Collection-and-chemical-modification-of-chitosan-oligosaccharides.pdf).
- 55) Cabrera, J.C.; Messiaen, J.; Cambier, P.; Van Cutsem, P. (2006). "Size, acetylation and concentration of chito-oligosaccharide elicitors determine the switch from defence involving PAL activation to cell death and water peroxide production in *Arabidopsis* cell suspensions". *Physiologia Plantarum* 127: 44-56.  
 doi. 10.1111/j.1399-3054.2006.00677.x.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.2006.00677.x/pdf>.
- 56) Fussi, F.; Díaz, V.B.; Dománico, R.H.; Fuentes, E.P. (1994). "Substances with heparin-like structure and their methods of production". U.S. Patent 5340932 (also published as EP 430248 B1).
- 57) Ibrahim, K.A.; El-Eswed, B.I.; Abu-Sbeih, K.A.; Arafat, T.A. and others (2016). "Preparation of chito-oligomers by hydrolysis of chitosan in the presence of zeolite

- as adsorbent”. *Marine Drugs* 14:43.  
doi: 10.3390/md14080043.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4999900/>
- 58) Yaku, F.; Tanaka, R.; Muraki, E.; Fujishima, S.; Miya, M. (1990). “Process for preparing chitosan oligosaccharides”. U.S. Patenet 4970150.
  - 59) Roncal, T.; Oviedo, A.; López de Armentia, I.; Fernández, I.; Villarán, M.C. (2007). “High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan”. *Carbohydr. Res.* 342: 2750-2756.  
doi: 10.1016/j.carres.2007.08.023.
  - 60) Zimoch-Korzycka, A.; Gardrat, Ch.; Castellan, A.; Coma, V.; Jarmoluk, A. (2015). “The use of lysozyme to prepare biologically active chitooligomers”. *Polímeros* 25(1): 35-41.  
doi: 10.1590/0104-1428.1630.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44510212/The\\_use\\_of\\_lysozyme\\_to\\_prepare\\_biologica20160407-32749-6ucif3.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53U-L3A&Expires=1510856920&Signature=sf7TZrVla-QQJ%2FbGOrmziW0C6veU%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DThe\\_use\\_of\\_lysozyme\\_to\\_prepare\\_biologica.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44510212/The_use_of_lysozyme_to_prepare_biologica20160407-32749-6ucif3.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53U-L3A&Expires=1510856920&Signature=sf7TZrVla-QQJ%2FbGOrmziW0C6veU%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DThe_use_of_lysozyme_to_prepare_biologica.pdf)
  - 61) Deepmala, K.; Hemantaranjam, A.; Bharti, S.; Nishant Bhanu, A. (2014). “A future perspective in crop protection: Chitosan and its oligosaccharides”. *Adv. Plants Agric. Res.* 1(1): 00006.

- doi: 10.15406/apar.2014.01.00006.  
<http://medcraveonline.com/APAR/APAR-01-00006.php>.
- 62) Fenton, H.J.H. (1876). "On a new reaction of tartaric acid". *Chem. News*, 33: 190.
  - 63) Fenton, H.J.H. (1896). "Constitution of a new dibasic acid resulting from the oxidation of tartaric acid". *J. Chem. Soc., Trans.*, 69: 546-562.
  - 64) IUPAC Compendium of Chemical Terminology (2003). *Fenton Reaction*. 1997, 69: 1274.
  - 65) Koppenol, W.H. (2000). "Facts and Fiction in Free-Radical Biochemistry: The Haber-Weiss Cycle". *Oxygen Society Ann. Meeting (Sunrise Free Radical School)*, San Diego, CA, Nov. 17-20.  
<http://sfrbm.org/site/assets/documents/frs/Koppenol2000.pdf>.
  - 66) Haber, F.; Wilstatter, R. (1931). "Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktions-mechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge". *Chem. Ber.* 64: 2844-2856.
  - 67) Haber, F.; Weiss, J. (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes". *Naturwiss.* 51: 948-950.  
doi: 10.1007/BF01504715.
  - 68) Yin, X.; Zhang, X.; Lin, Q.; Feng, Y.; Yu, W.; Zhang, Q. (2004). "Metal-coordinating controlled oxidative degradation of chitosan and antioxidant activity of chitosan-metal complex". *Arkivoc* IX: 66-78.  
<https://www.arkat-usa.org/?VIEW=MANUSCRIPT&MSID=1087>.
  - 69) Mourya, V.K.; Inamdar, N.N.; Choldhari, Y.M. (2011).

- “Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications”. *Polymer Sci. Series A*, 53(7): 583-612.  
doi: 10.1134/S0965545X11070066.  
[https://www.researchgate.net/profile/Nazma\\_Inamdar/publication/225768920\\_Chitooligosaccharides\\_Synthesis\\_Characterization\\_and\\_Applications/links/02e7e52f892a526f26000000/Chitooligosaccharides-Synthesis-Characterization-and-Applications.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Nazma_Inamdar/publication/225768920_Chitooligosaccharides_Synthesis_Characterization_and_Applications/links/02e7e52f892a526f26000000/Chitooligosaccharides-Synthesis-Characterization-and-Applications.pdf).
- 70) Lárez Velásquez, C.; Chirinos, A.; Tacoronte, M.; Mora, A. (2012). “Chitosan oligomers as bio-stimulants to zucchini (*Cucurbita pepo*) seeds germination”. *Agriculture (Polwohospodárstvo)* 58(3): 113-119.
  - 71) Smith, F.; Montgomery, R. (1963). “End group analyses of polysaccharides”. *Methods of Bioch. Anal.* 3: 153-212.  
doi: 10.1002/9780470110195.ch6.
  - 72) Glasstone, S. (1957). *Tratado de Química Física* (Aguilar, Madrid): 939-941.
  - 73) Vogel, A.I. (1960). *Química Analítica Cuantitativa*. op. cit. I: 484-485.
  - 74) Bindoli, A.; Cavallini, L. (1980). *I radicali libere. Aspetti biochimici e medici* (Piccin Editore, Padova): 76-89.
  - 75) De Ambrosi, L.; Recchia, W.; Ferrari, G. (1991). “Process for the controlled preparation of low molecular weight glucosaminoglycons”. U.S. Patent 4987222 A (Europ. Patent 0269937 B1).
  - 76) De Ambrosi, L.; Iannacone, N.; Gonella, S.; Vismara, E.; Nesti, S.; Torri, G. (2003). “Process for the physical depolymerization of glycosaminoglycans and products obtained therefrom”. *World Pat. Appl.* WO 2004000886 A1.
  - 77) Díaz, V.B. Observaciones personales no publicadas.



- 78) Choi, W-S.; Ahn, K-J.; Lee, D-W.; Byun, M-W.; Park, H-J. (2002). "Preparation of chitosan oligomers by irradiation". *Polymer Degradation and Stability* 78: 533-538.  
<http://pack.korea.ac.kr/non/26.pdf>.
- 79) Du, D.X.; Moi, V.Q.; Duy, N.N.; Phu, D.V.; Hien, N.Q. (2014). "Degradation of chitosan by  $\gamma$ -irradiation of chitosan swollen in hydrogen peroxide solution". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 52: 441-450.  
<http://vjs.ac.vn/index.php/jst/article/viewFile/3820/4324>.
- 80) El-Sawy, N.M.; El-Rehim, H.A.; Elbarbary, A.M.; Hegazy, E-S. (2010). "Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purposes". *Carbohydr. Polymers* 79: 555-562.  
doi: 10.1016/j.carbpol.2009.09.002.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43524362/Radiation-induced\\_degradation\\_of\\_chitosa20160308-27449-1ihrlwj.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510873181&Signature=hVU9U65bMjukPhaywO717luOmvg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DRadiation-induced\\_degradation\\_of\\_chitosa.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43524362/Radiation-induced_degradation_of_chitosa20160308-27449-1ihrlwj.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510873181&Signature=hVU9U65bMjukPhaywO717luOmvg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DRadiation-induced_degradation_of_chitosa.pdf).
- 81) Yoksan, R.; Akashi, M.; Miyata, M.; Chirachanchai, S. (2004). "Optimal  $\gamma$ -ray dose and irradiation conditions for producing low molecular weight chitosan that retains its chemical structure". *Radiat. Res.* 161: 471-480.  
doi: 10.1667/RR3125.

- 82) Hien, N.Q. (no date). "Working material: Study of chemical treatment combined with radiation to prepare biotic elicitor for utilization in agriculture". 187-193.  
[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/46/015/46015348.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/46/015/46015348.pdf)
- 83) Kewsuwan, P.; Chukaew, S. (2016). "Influence of degradation of chitosan by gamma irradiation on growth enhancement of corn". *Energy Procedia* 89: 395-400.  
doi: 10.1016/j.egypro.2016.05.052.  
[https://ac.els-cdn.com/S1876610216300601/1-s2.0-S1876610216300601-main.pdf?\\_tid=ca9a-35fe-cb1b-11e7-8dab-00000aab0f27&acdnat=1510870768\\_822ae9ffb188e8c6ab826f14cf9f0529](https://ac.els-cdn.com/S1876610216300601/1-s2.0-S1876610216300601-main.pdf?_tid=ca9a-35fe-cb1b-11e7-8dab-00000aab0f27&acdnat=1510870768_822ae9ffb188e8c6ab826f14cf9f0529).
- 84) IAEA TECDOC SERIES (IAEA-TECDOC-1745) (2014). "Radiation processed materials in products from polymers for agricultural applications".  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).

**CAPÍTULO 4**

**OLIGOSACÁRIDOS DERIVADOS  
DE ALGINATOS  
Y FRUCTOPOLISACÁRIDOS:  
PRODUCCIÓN QUÍMICA**



## 4.1 Oligosacáridos derivados de alginatos

Los alginatos (ácido algínico) son polisacáridos lineales conformados por la unión de 2 monómeros de ácidos urónicos diferentes,  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico, los cuales están contenidos en la mayoría de las algas marrones superiores. El alginato no es una sustancia única, por el contrario, despliega diversidad de microheterogeneidades a lo largo de su cadena, fundamentalmente dependientes de la fuente vegetal de procedencia y de la mayor o menor agresividad de los métodos de aislamiento y purificación. Esto hace necesario seleccionar género y especie del alga de la cual se desea obtener el alginato, teniendo en mente el uso final que se le desea dar al polisacárido obtenido. A tal fin, las algas más importantes desde el punto de vista comercial son aquellas pertenecientes a los géneros *Laminaria* (*hyperborea*, *japonica*, *digitata*, etc.), *Macrocystis* y *Ascophyllum* (1).

Gran cantidad del alginato producido se utiliza para la industria alimentaria y farmacéutica, y el material sobrante

o de desecho de estos procesos se aprovechan para su conversión en oligosacarinas (alginoligosacarinas, ALOS).

Se ha mencionado ya la presencia de microheterogeneidades en la cadena del polisacárido y al respecto se ha establecido que el polímero presenta tres clases de regiones, a saber:

- Región G (solo constituida por L-gulurónico).
- Región M (solo constituida por D-manurónico).
- Región MG (unidades alternativas de uno y otro resto ácido).

De manera que, como en muchos otros polisacáridos, los alginatos son copolímeros de los dos restos urónicos ya citados, y es precisamente esta diversidad estructural la que influye decisivamente en las propiedades físicas de los alginatos. Dado que la relación entre estas microrregiones estructurales no son idénticas, la medida de la relación ManH/GulH se torna importante (1). Si bien existen enzimas (manurónico-5 epimerasa) que convierte el resto manurónico en gulurónico, el método no ha sido aplicado a escala comercial (1).

Los procesos para la obtención de los alginatos son fundamentalmente de dos tipos: en el primero, los principales intermedios son ácido algínico y alginato de calcio. En el segundo, no se obtiene alginato cálcico y se forma solo ácido algínico (2). Naturalmente, las corporaciones industriales dedicadas a la obtención de estos productos de origen marino, almacenan considerable conocimientos y pericia sobre estos procesos (2).

En este volumen, no se insistirá sobre los métodos de

producción de alginato, dado que existen artículos autorizados fácilmente disponibles. Sin embargo, es prudente citar algunas etapas de aislamiento y purificación que pueden influir decididamente sobre la estructura y el peso molecular del polisacárido obtenido. Tanto en el proceso denominado “del alginato de calcio” como en el “método ácido”, estas etapas delicadas son:

- Tratamiento ácido
- Tratamiento alcalino
- Procesos de blanqueo (formaldehído e hipoclorito), si bien es cierto que el proceso de blanqueo no parece ser utilizado por algunos fabricantes expertos (2).

Sucintamente, el tratamiento ácido tiene por objeto liberar el ácido algínico de su sal cálcica (estado en el que se encuentra en el vegetal), remover compuestos fenólicos coloreados (que formarán productos de condensación con el álcali posterior) y facilitar la extracción en medio alcalino.

No obstante, de acuerdo con las condiciones de tratamiento ácido, puede ocurrir depolimerización hidrolítica en alguna extensión (1). El tratamiento alcalino efectuado a continuación depende estrictamente de la temperatura del medio, pues es evidente que, llevado a cabo en condiciones sub-óptimas, pueden ocurrir condensaciones, olefinización del carbohidrato y aparición de indeseables cuerpos coloreados.

El tratamiento con formaldehído tiene por objeto la precipitación de cuerpos fenólicos que pueden originar coloraciones recalcitrantes. Los fenoles se separan por filtración.

El proceso de blanqueado con  $\text{NaOCl}$  tiene por objeto brindar productos bien decolorados para usos alimenticios

o farmacéuticos, pero si el material será usado como materia prima para la obtención de ALOS, dicho proceso no reviste mayor importancia, sobre todo teniendo en cuenta que en general los procesos de fabricación de ALOS incluyen un método físico de decoloración.

Se estimula fuertemente la consulta del documento (1).

A través de los distintos métodos que se detallarán a continuación, se obtienen excelentes productos comerciales a base de ALOS, los cuales presentan relevantes efectos sobre el crecimiento radicular, tolerancia al stress vegetal e insuficiencias nutricionales (3).

Los métodos de producción utilizados en la preparación de algin-oligosacarinas (ALOS) son métodos generales ya citados en los capítulos 2 y 3 de esta contribución, a saber:

- Depolimerización radiolítica del alginato
- Depolimerización óxido-reductiva (reacción Fenton)
- Depolimerización enzimática
- Hidrólisis ácida
- Hidrotermólisis (conversión hidrotérmica del alginato con agua en condiciones sub-críticas).

### **4.1.1 Depolimerización radiolítica de alginatos**

Se debe tener en cuenta, acorde con el Organismo Internacional de Energía Atómica (4) que “aún existe un uso limitado de las técnicas de radiación a escala técnica con el objeto de producir materiales para aplicaciones a la Agricultura debido a dificultades en la investigación y el desa-



rollo e importantes problemas vinculados al escalado de los procesos”.

El producto irradiado habitualmente es alginato de sodio, con rayos  $\gamma$  provisto por una fuente de Co-60 a variadas intensidades y dosis de radiación, concentración del polisacárido en su solución acuosa (o aún en estado sólido), temperatura de operación y adición o no de coadyuvantes, tal como el  $H_2O_2$  (radiólisis asistida por peróxidos).

Smolko y col. (5) han irradiado alginato de sodio en estado sólido en una escala que cubre desde 50 a 1000 kGy, a dosis de 10 kGy/h; el producto irradiado en forma sólida presenta excelentes propiedades fitoestimulantes, en particular, aquellas muestras irradiadas a 100 kGy.

En los trabajos realizados ya referenciados y en los que siguen, se observa que, notablemente, el alginato irradiado crudo se emplea directamente en los ensayos de eficiencia agronómica, sin purificar ni fraccionar para seleccionar fracción alguna.

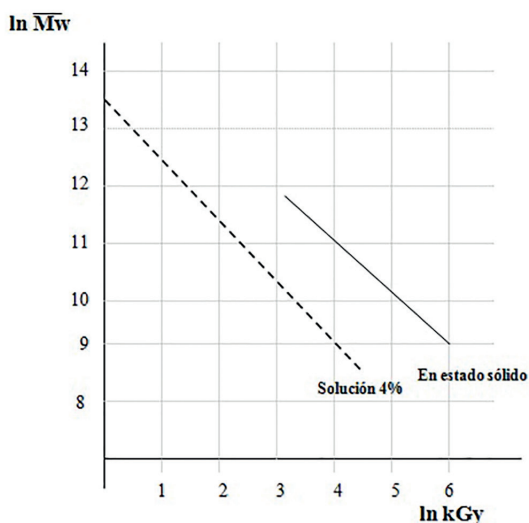
Se ha utilizado alginato sódico irradiado a 520 kGy para la estimulación de la producción de aceites esenciales (6) y constituyentes fitoquímicos biológicamente activos (7): el peso molecular medio del alginato depolimerizado era de 595000 Da (habitualmente, el peso molecular de la fracción activa de las oligosacarinas es mucho menor, como se ha visto en los capítulos anteriores; se verá que el caso del alginato no es una excepción).

Makuuchi y colaboradores (8) irradian alginato en estado sólido y en solución acuosa, entre 10-500 kGy con el objeto de producir oligómeros útiles como promotores de crecimiento vegetal. Este grupo de investigación realizó un interesante estudio sobre la caída del peso molecular me-

dio en función de la intensidad de radiación, la dosis y la concentración de la solución acuosa y/o estado sólido del sustrato, habiendo obtenido ALOS de peso molecular comprendido entre 6400-9000 Dalton controlando la dosis de radiación con el objeto de detener el proceso en todo instante prefijado.

La evolución del peso molecular medio en función de la tasa de radiación se encuentra bien documentada (9) (10) y expuesta en la Figura 4.1.

**Figura 4.1: Evolución del peso molecular medio del alginato en función de la dosis de radiación  $\gamma$**



**Fuente: elaboración propia en base a referencias (9) (10)**

De acuerdo con (10), la fracción de alginato irradiado de peso molecular comprendido entre 1000-3000 Da mostró un notable efecto sobre la promoción del crecimiento del arroz.

Aun con las dificultades que ya se han detallado (4), los métodos basados en la irradiación y son, preferentemente, los procesos más utilizados para la obtención de ALOS con fines agrícolas, junto con los métodos de depolimerización óxido-reductiva que se presentan a continuación.

### **4.1.2 Depolimerización óxido-reductiva (reacción Fenton)**

Las aplicaciones de la reacción de Fenton (véase 3.2.1.4) a la depolimerización óxido-reductiva de los alginatos fueron descritas en un admirable trabajo por Smidsrød, Haug y Larsen (11) en el año 1965. Este mismo grupo, en 1967 (12), publicó la tasa de degradación de diferentes polisacáridos (entre los que se encuentra el alginato) a través de mecanismos Fenton, habiendo demostrado que la velocidad de depolimerización es aproximadamente la misma para polisacáridos neutros que para polisacáridos que contienen grupos carboxilo (no sucede lo mismo para polisacáridos sulfatados).

Este tipo de aplicaciones de la reacción de Fenton, tempranamente documentadas, se han convertido, con distintas variantes, en uno de los principales métodos de obtención de ALOS, conjuntamente con los procesos radiolíticos ya detallados.

Marritt (13), en el año 2002, presenta una solicitud de pa-

tente sumamente interesante, dado el enfoque exhaustivo que hace sobre diferentes aspectos:

- Proporciona una revisión bibliográfica histórica del arte previo muy detallada, con discusiones descriptivas.
- Describe la ineficiencia de la reacción en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin catalizador (aún a alta temperatura) en comparación con el proceso que utiliza  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{++}$  (característicamente Fenton).
- Procede a la depolimerización de alginatos en soluciones adecuadamente concentradas, apto para la práctica industrial.
- Obtiene oligosacáridos ricos en ácido gulurónico, manurónico o en regiones manurónico-gulurónico por cuidadosa selección del alginato derivado de diferentes especies vegetales de algas.
- La reacción de depolimerización puede ser llevada a cabo a través de una adición total de la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o bien utilizando una adición por etapas.

La solicitud de patente china CN 1544444 A (14) introduce el concepto de fraccionamiento por columna de permeación en geles, aislando la fracción correspondiente a 1-19 monómeros (peso molecular aproximado 200-3500 Da).

En este punto, cabe destacar lo siguiente: en términos generales, el proceso Fenton llevado a cabo sobre polisacáridos introduce microheterogeneidades moleculares en la cadena del carbohidrato, además de la reacción principal de depolimerización. El alginato no escapa a esa regla general y las irregularidades producidas sobre la cadena del oligo-

mero (aparición de grupos carboxilo) están bien descritas y caracterizadas (15). Dado que, en general, la reacción fundamental puede privilegiarse frente a la reacción parásita por el adecuado manejo de las condiciones de reacción, las deformaciones estructurales pueden minimizarse recurriendo a procesos llevados a cabo a temperaturas elevadas (cercanas a la ebullición del agua), reduciendo la cantidad de  $\text{Fe}^{++}$  agregada (el cual cataliza también la reacción parásita) y acortando ciertamente los tiempos de reacción al trabajar a mayores temperaturas.

Paralelamente, otra alternativa plausible es operar a temperatura moderada ( $50\text{--}60^\circ\text{C}$ ) soluciones concentradas del polisacárido, con fuerte agitación y goteo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , habiendo agregado previamente el catalizador  $\text{Fe}^{++}$  ( $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

El equipo será dispuesto en modo reflujo y el goteo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (en solución medianamente concentrada, por ejemplo, 15% p/V, dilución al medio de la solución comercial 30%) se puede graduar para que en todo momento de la reacción no haya abundante exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el seno del proceso. El pH deberá ser de 6 o menor, pero no excesivamente ácido, pues espontáneamente el valor de pH desciende conforme progresa la reacción catalizada.

En todo caso, la alteración concomitante de la estructura catenaria, aunque minimizada, se hace notable por el desarrollo de coloración que se observa conforme progresa la reacción. Este fenómeno no es particular del caso de los alginatos frente a la actividad del  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{++}$ , sino que afecta en general a todos los polisacáridos utilizados como sustratos en estos procesos y, además, en métodos que emplean irradiación y, hidrólisis ácida, hidrotermólisis, etc.

Desde este punto de vista, puede ser interesante revisar los procesos de blanqueo que pueden tener lugar luego de aislar el producto crudo de reacción, por detención de la misma al tiempo prefijado y precipitación con exceso de etanol (secuestrador o “scavenger” de radicales  $\text{OH}^\cdot$ ).

#### **4.1.2.1 Decoloración (blanqueo) del oligosacárido “crudo” de reacción**

Es habitual que luego de un proceso de depolimerización, el oligómero obtenido presente coloración a un grado muchas veces inaceptable; en este sentido, los mecanismos de hidrólisis enzimática, debido a su extrema suavidad, parecen ser la excepción.

Pero corrientemente, el producto crudo de reacción necesita ser decolorado (blanqueado) antes de seguir con las etapas de fraccionamiento y como un primer paso de purificación.

Hay etapas de decoloración física y otras químicas. Los procesos físicos están constituidos por las cromatografías de adsorción sobre resinas poliméricas adsorbentes, empleo de carbón activado y/o pasaje a través de columnas de hidroxiapatita (16). Tampoco puede descartarse el uso de resinas de intercambio, sobre todo en el caso presente, en donde el oligómero es un políácido carboxílico capaz de vincularse a una resina de intercambio aniónico. Se revisarán estos aspectos más detalladamente, aplicados a la decoloración de alginatos, aunque debe tenerse en cuenta su aplicación general. El técnico adiestrado en el arte sabrá encontrar la secuencia de etapas de decoloración más adecuada al caso sobre el que se encuentre trabajando.

Los métodos de blanqueo químico generalmente reposan en el uso de sustancias oxidantes o reductoras, capaces de eliminar o disminuir la intensidad de coloración introduciendo mínima o nula modificación estructural en la oligosacarina en etapa de blanqueo.

#### 4.1.2.1.1 Blanqueo químico

Si el agente blanqueador está bien elegido, conceptualmente su realización es sencilla y la eliminación de sus productos de reacción se facilita si se usan “blanqueadores limpios”, tales como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o los perácidos, en particular, el ácido peracético.

El blanqueo químico es una decoloración que ocurre en solución y elimina las sustancias coloreadas. Estas sustancias habitualmente son compuestos orgánicos que en su estructura molecular incluyen dobles enlaces susceptibles de conjugación (alternancia de simples y dobles enlaces, fenómeno que puede ser promovido por la presencia de grupos carbonílicos, arílicos e incluso heteroátomos tales como el N).

De tal forma, el blanqueo destruye uno o más de los dobles enlaces de la sustancia coloreada o bien oxida grupos reductores tal como el carbonílico.

La molécula desplaza su máximo de absorción luminosa desde la región visible a la ultravioleta y, por tanto, se verifica desaparición o disminución de color (17).

Estos grupos responsables de la aparición de color se denominan “cromóforos”. Szilard (18) ha publicado un interesantísimo libro sobre técnicas y agentes blanqueantes, el cual dista mucho de haber perdido interés.

En la utilización de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente blanqueante oxidante, la especie reactiva es el anión perhidroxilo  $\text{OOH}^-$ , el cual se genera vía la ionización del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (19).

La constante de ionización del agua es muy pequeña ( $2 \times 10^{-12}$ ) y por tanto, el medio debe ser alcalino, con arreglo a elevar la concentración de  $\text{OOH}^-$ . Sin embargo, el pH debería ser inferior a 11, dado que a ese valor de pH comienza la descomposición de  $\text{OOH}^-$  (19) con generación de  $\text{O}_2$  y  $\text{OH}^-$ . Por tal razón, es común que las etapas de blanqueo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  se hagan a pH alcalino, generalmente entre pH = 8-9,5, sobre todo tratándose del blanqueo de carbohidratos susceptibles.

Como blanqueadores reductores, se encuentran el sulfito, bisulfito, hidrosulfitos o ditionitos ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ) y el borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ), pero son poco utilizados para el blanqueo de ALOS.

El empleo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de ácido peracético para el blanqueo de alginatos es una técnica bien documentada desde hace cuarenta años a la fecha y en continua aplicación industrial (20). En este documento patentario se hace notar, precisamente, que el blanqueo con  $\text{H}_2\text{O}_2$  debe conducirse a valores de pH superiores a 4, en orden a favorecer la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aconsejando lo mismo para el blanqueo del alginato con ácido peracético (20). Por cierto, es bien conocido que la descomposición espontánea del ácido peracético alcanza su máximo a pH 8,2 (21), lo cual brinda el fundamento y la explicación del hecho de blanquear soluciones de polisacáridos en general, a temperatura ambiente y pH comprendido entre los valores 8,0-8,2.



En el caso de blanqueo de oligosacarinas (no solo oligómeros del alginato), el oxidante empleado preferentemente es el ácido peracético, del cual existen excelentes preparaciones comerciales (Divosan® Forte; Diverseey); este material contiene 15% de ácido peracético y 26% de  $H_2O_2$  en solución estabilizada, y tiene multiplicidad de aplicaciones industriales, como decolorante, germicida y sanitizante, e incluso para la limpieza y sanitización de filtros y ultrafiltros (22).

Para el blanqueo de oligosacáridos, en solución acuosa, el blanqueador que contenga ácido peracético debería agregarse en cantidad suficiente para obtener 0,3% p/V de  $CH_3COOH$  en el volumen acuoso total a blanquear, agitando suavemente y manteniendo constante el pH entre los valores 8,0-8,2 por las razones detalladas, y el tiempo de blanqueo comprendido entre 1-2 horas (20).

Cumplido el plazo determinado bajo experimentación, el material blanqueado se precipita con exceso de etanol, con el objeto de minimizar la cantidad de oxidante residual en el carbohidrato. Restos de oxidante se eliminarán posteriormente por redisolución del material en agua y adición de un reductor (generalmente bisulfito o metabisulfito) hasta reacción negativa de oxidantes frente el conocido test de KI-almidón.

El uso de peracético como agente blanqueante es muy interesante por su baja reactividad frente a la molécula del oligosacárido (en las condiciones citadas).

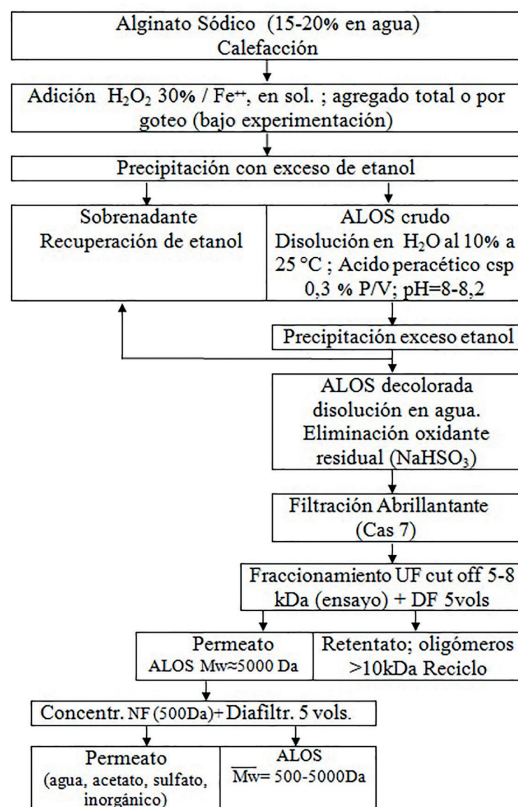
Por ejemplo, un polisacárido lábil, tal como el almidón, se blanquea con ácido peracético diluido a un máximo de 0,45% de oxígeno activo, en una reacción que solo destruye los cuerpos coloreados, con poca o ninguna alteración del

almidón, operando a temperatura ambiente y a la concentración citada (23).

En la Figura 4.2 se presenta un esquema de flujo orientativo (I) sobre posibles operaciones de blanqueo químico de oligosacarinas y de ALOS en particular, procedentes de procesos Fenton. Sin embargo, se pone el acento sobre la utilidad del método para el blanqueo de otros oligosacáridos provenientes de otros métodos de depolimerización, tal como ya se ha detallado.

En la Figura 4.3 se presenta un método tentativo (II) que incluye una etapa de fraccionamiento con resinas de intercambio aniónico para la obtención de las fracciones deseadas de oligómeros.

**Figura 4.2: Producción de algin-oligosacarinas (ALOS)**  
por depolimerización vía procesos Fenton: método tentativo I



**Fuente:**Elaboración propia, en base a referencias (12) (13) (14) (15) (17) (19) (21)

Se ha adelantado que la Figura 4.3 presenta un fraccionamiento de los oligómeros del alginato a través de cromatografía de intercambio aniónico, en tanto estos carbohidratos son de naturaleza policarboxílica.

A este fraccionamiento, habitualmente sigue en la actualidad, una etapa de “refinado” o “pulido” por técnicas de UF/NF acompañadas de operaciones de diafiltración.

En este punto, se procederá a clarificar dos aspectos relativos al fraccionamiento con resinas de intercambio, si bien estas técnicas son bien conocidas y no necesitan mayores comentarios.

El alginato, así como la pectina y el ácido hialurónico (polisacárido obtenido de tejidos animales) son ácidos policarboxílicos y su conducta frente a una resina de intercambio aniónico presenta fuertes similitudes.

En una excelente revisión histórica bibliográfica, Rodén y colaboradores (24) presentaron el fraccionamiento de polisacáridos eléctricamente cargados vía cromatografía de intercambio, entre ellos, el ácido hialurónico, habiendo comprobado que el mismo eluye de una resina Dowex® 1-X2 a una molaridad de NaCl comprendida entre 0,27 y 0,78 M (24).

Anteriormente, Scott (25), en un trabajo excepcional, había demostrado la similitud de comportamiento frente al intercambio de alginato y hialuronato a partir de sus sales de amonio cuaternario.

Esto habilita, aunque sea tan solo como orientación, a la selección de la molaridad de NaCl para distintas fracciones de alginato, tomando en cuenta los datos que ofrece la literatura para el ácido hialurónico.

En la interacción entre el polisacárido policarboxílico y la resina de intercambio iónico necesariamente ocurre una adsorción del primero a la resina aniónica, aunque sea en proporciones mínimas: tal ocurre en los procesos de desalado de las soluciones de carbohidrato vía el empleo de resinas de

intercambio iónico, tal como fue tempranamente reportado (26). En este sentido, se ha publicado una excelente separación de oligosacáridos aniónicos sobre resina de intercambio aniónico débil operando entre pH 5,5-9 (27). En particular, la citada referencia brinda interesantes peculiaridades: la primera de ellas es usar buffers tal como la solución de  $\text{NH}_4\text{HCOO}$ , la cual por llevar disuelta una sal volátil evita posteriores fases de purificación. La segunda mención es introducir al efecto el uso de resinas de intercambio aniónico débil para la separación de este tipo de oligosacáridos.

Los estudios basados en el fraccionamiento de resinas aniónicas no se han limitado a la separación de fracciones de un mismo polisacárido, sino a la resolución de mezclas de las mismos, en particular, aquellos polisacáridos contenidos en las algas (28). El uso de resinas aniónicas débiles para el fraccionamiento de carbohidratos carboxílicos está ampliamente documentado (29).

Naturalmente, el fraccionamiento se lleva a cabo a través de un proceso de elución en gradiente continuo (también puede conducirse vía elución por etapas), en donde el valor de pH adecuado está comprendido por debajo del pKa de los ácidos urónicos (ca 3-4) (29). En la práctica, el eluyente de elección es la solución de NaCl por su disponibilidad y amplia asequibilidad a bajos costos. Pero es cierto que el fraccionamiento de oligoalginatos haciendo juegos de pH tiene sus limitaciones, dado que son susceptibles de sufrir reacciones de beta-eliminación aún a pH relativamente ácido (30). Sin embargo, es posible operar sin mayores inconvenientes a pH comprendido entre los valores 4-7 (30). Ballance et al (31) han publicado un excelente estudio sobre

el tema que se está tratando, sobre el cual conviene poner de relieve los siguientes puntos:

- El fraccionamiento de oligoalginatos sobre resina aniónica permite su elución secuencial según el largo de cadena del oligómero.
- Se proporciona un método que permite establecer la relación estimada promedio de restos manurónico-gulurónico en la fracción particular de oligosacárido.
- Se determina de esta manera la distribución molecular.

Cabe en este punto efectuar una aclaración accesoria a los trabajos referenciados, que es la siguiente:

El uso de resinas aniónicas débiles (preferentemente porosas) brinda una opción interesante. La resina aniónica débil contiene grupos catiónicos (amonio) vinculados a la matriz polimérica, capaces de intercambiar aniones, en tanto el amonio se encuentre como tal, es decir, en su forma cargada.

A medida que sube el pH del medio circundante, disminuye naturalmente la proporción de  $-\text{NH}_4^+$  y aumenta la proporción de grupos amino libres, los cuales no son susceptibles de intercambiar cuerpos eléctricamente cargados.

De manera que la elución de oligosacáridos sobre este tipo de resinas no solo puede realizarse modificando fuerza iónica, sino también haciendo un gradiente de pH del eluyente. En otras palabras, se pueden implementar tres formas de elución cada una de ellas solas o en combinación:

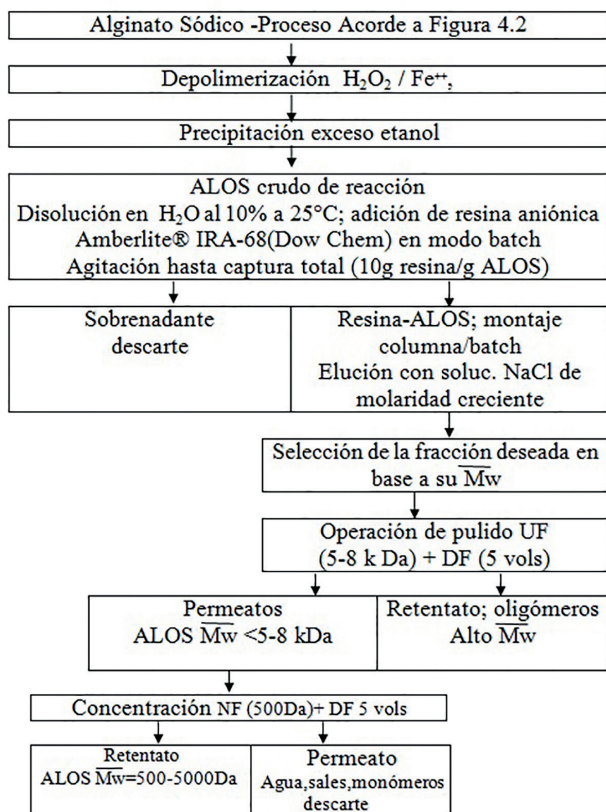
- Por aumento de la salinidad del eluyente a pH constante.
- Por aumento del pH del eluyente a fuerza iónica constante.
- Combinación de ambos, acorde al criterio del operador.

Se encuentra publicada una contribución que pone de relieve los aspectos técnicos de aplicación de las resinas aniónicas aplicadas al campo de los polisacáridos policarboxilados y sulfatados (16). En la actualidad existen disponibles variedades de resinas aniónicas débiles, tal como, por ejemplo, Amberlite<sup>TM</sup> IRA 67 (Rohm and Haas, ahora Dow Chemical Co.) (32), las cuales son sumamente adecuadas y versátiles para este campo de aplicaciones, además de tener un bajo costo, amplia disponibilidad y un tiempo de operación muy prolongado, lo que evita la necesidad del reemplazo de lechos.

El fraccionamiento de oligoalginatos por columna de intercambio aniónico, interesante desde el punto de vista de la obtención de fracciones estructuralmente diferenciadas, no se aplica a la producción industrial de ALOS. En cambio, presenta suma utilidad en el aislamiento de distintas fracciones a pequeña escala destinadas a ensayos de bioactividad vegetal.

La Figura 4.3 representa lo expuesto bajo la forma de un método tentativo de producción de ALOS vía procesos Fenton. El experto formado en el arte percibirá claramente que el proceso de fraccionamiento por resinas puede aplicarse a otros carbohidratos en forma no excluyente ni limitante.

Figura 4.3 Producción de ALOS vía Fenton:  
método tentativo II



**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (12) (13) (14) (15) (17) (19) (21) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32)



### 4.1.3 Depolimerización enzimática de alginatos

Los alginatos son depolimerizados enzimáticamente a través del empleo de alginatoliasas, obtenidas generalmente de microorganismos marinos (33), principalmente bacterias.

Acorde con la conducta general de las enzimas, actúan suavemente, a pH cercanos a la neutralidad y temperaturas ambientales, y han demostrado su especificidad (por lo menos, alguna de ellas) para la escisión del resto  $\beta$ -D-1,4-manuronato (33). Los oligosacáridos producidos con un peso molecular de aproximadamente 1800 Da (dímeros, trímeros y tetrámeros) han presentado interesante actividad vegetal (34).

La depolimerización del alginato a través del uso de alginato liasas se produce por ruptura de la unión entre los restos manurónico y/o gulurónico vía un mecanismo de  $\beta$ -eliminación con la formación concomitante de doble ligadura en el oligosacárido resultante (35).

Estas enzimas varían en su especificidad de corte hacia un resto urónico en particular, pero en general despliegan actividad hacia todos los enlaces glicosídicos presentes (35) habiéndose reportado un detallado método de hidrólisis enzimática de alginatos, cuya claridad y extensión exime de todo agregado (36).

El empleo de alginato liasas y su búsqueda a partir de nuevos microorganismos es un campo en permanente actividad, dada su perfecta adecuabilidad a los sistemas de producción técnica a gran escala de los preciados ALOS (37).

#### 4.1.4 Hidrólisis ácida de alginatos

En la práctica técnica, la degradación ácida hidrolítica de los alginatos se lleva a cabo con ácido clorhídrico, en solución aceptablemente concentrada de alginato (ca 3%), ajustando la acidez por agregado de ácido hasta lograr un pH comprendido entre 3-4. El proceso puede conducirse a temperatura de alrededor de 60-80°C, o bien a temperatura de autoclave (38) (121°C) durante tiempos de reacción a determinar. Raramente es necesario elegir alginatos con predominancia de manuronato o de guluronato, aunque los aspectos relacionados a la bioactividad en base a mayor contenido de estos restos ácidos, se encuentran bajo permanente estudio (38) (39). González et al (40) comparan los oligosacáridos de alginato producidos por radiólisis  $\gamma$ , hidrólisis ácida y degradación enzimática (todos los productos comprendidos en un grado de polimerización entre 2-9), en lo relativo a sus diferentes bioactividades.

En los procesos de hidrólisis ácida, el producto de reacción se encuentra coloreado, a veces en forma importante.

Los procesos de decoloración de los oligosacáridos crudos de reacción han sido descriptos en 4.1.2.1 y no necesitan ser más detallados.

Los métodos de purificación, fraccionamiento y selección de las fracciones deseadas vienen siendo detallados y graficados y por tratarse de criterios no excluyentes ni limitativos, son perfectamente aplicables al caso que se está tratando.

### 4.1.5 Hidrotermólisis de alginatos

Los métodos hidrotermolíticos aplicados a la degradación de alginatos son sumamente promisorios, dado su carácter compatible con el medio ambiente, ausencia de reactivos caros y modulabilidad de las condiciones de reacción para obtener oligómeros de distinto tipo. Sin embargo, la revisión de la bibliografía científica y de patentes presenta pocas publicaciones al respecto y menos aún sobre procesos hidrotermolíticos aplicados a la producción técnica de ALOS.

Probablemente esto se deba a que los procesos Fenton son más accesibles desde el punto de vista industrial y porque la degradación por hidrólisis térmica presenta una velocidad despreciable frente a la que exhibe la depolimerización con  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{Fe}^{++}$  a las temperaturas de ocurrencia de esta última (50-80°C) (15). La necesidad del empleo de altas temperaturas y presiones (condiciones subcríticas) pueden dificultar el uso de la hidrotermólisis frente a otros procesos más económicos.

En todo caso, se procederá al examen de referencias bibliográficas “características”, cuyo estudio permitirá al experto en el arte la concreción de métodos hidrotermolíticos de producción de ALOS.

Jeon et al (41) obtienen oligómeros de alginato operando entre 180-200°C como condición óptima, sobre una solución acuosa de alginato sódico al 2%; estos autores efectúan un cuidadoso estudio de las condiciones hidrotermolíticas (120-240°C) y demuestran que la cantidad de monómeros de ácidos urónicos generados crece por arriba de los 200°C.

Aida y colaboradores (42) optan por operar a las temperaturas comprendidas entre 180 y 250°C, lo que incluye las condiciones encontradas posteriormente por Jeon (41).

Meillisa y su equipo de estudios operan sobre una solución acuosa de alginato al 4% con 1% de ácido fórmico como catalizador ácido y exploran las condiciones entre 180-260°C. Se encontró como temperatura preferencial 180°C.

De manera que parece haberse establecido buen acuerdo entre los distintos equipos de investigación sobre las temperaturas de operación: 180-200°C parece un valor aceptable para comenzar estudios de desarrollo aplicado a cada caso particular, con concentraciones iniciales de polisacárido de 3-5% en solución acuosa.

El diseño y la construcción de un reactor de escala de banco puede ser encontrando en detalle en la relevante Tesis de Doctorado de D. Knežević (44) y en la revisión bibliográfica histórica presentada por H.A. Ruiz y col. (45).

Sin embargo, el presente autor es consciente de que la construcción o compra de estos equipos puede ser onerosa, sobre todo para países subdesarrollados.

Este autor ha obtenido excelentes resultados a través de la utilización de un mini-reactor construido en acero inoxidable, sin agitación y provisto de collar de presión, de acuerdo con los lineamientos y planos publicados en el clásico tratado de Química Orgánica de A.I. Vogel (46).

## 4.2 Fructooligoscáridos; fructooligosacarinas (FOS)

Tanto como le consta al presente autor, el grupo de las FOS ha sido el menos estudiado de todas las oligosacarinas. Esto incluye su aplicación a los cultivos vegetales, su determinación de bioactividad y el desarrollo de métodos de producción que partan de materiales asequibles con buen rendimiento y constancia de calidad de las FOS obtenidas.

Fundamentalmente, el grupo de FOS ha sido estudiado y aplicado al campo de los alimentos, sobre todo como prebióticos, con lo cual los esfuerzos se han centrado en la producción de FOS de pureza cada vez mayor (47) y en ese sentido, la producción biotecnológica parece ser la vía de elección (48) (49) (50) (51) (52).

En sus formas más sencillas, estos métodos son practicados para la producción de FOS con fines agrícolas, en general, obtenidos como subproductos de la fabricación de sus similares para usos alimenticios. Balar et al (53) han publicado un método de obtención de FOS para usos en agricultura partiendo del procesamiento de la planta de *Agave* sp. El vegetal, rico en polifructanos (polifruktuosa, polifruktosanos, inulina), es extraído en medio acuoso y el extracto obtenido es hidrolizado enzimáticamente con el objeto de obtener los FOS correspondientes.

El jarabe de sacarosa también puede ser convertido enzimáticamente en fracciones ricas en FOS (54) y, en general, diversos sustratos azucarados sirven de base para la obtención de FOS a través de tratamientos con consorcios microbianos (55).

No obstante, a pesar de la asequibilidad comercial de excelentes preparados con actividad inulinásica (Novozymes), la obtención de FOS con fines agrícolas basada en la hidrólisis enzimática de fructanos parece poco favorable económicamente, por lo menos, en las industrias radicadas en países en desarrollo.

### 4.2.1 Hidrólisis ácida de polifructanos

Una alternativa muy aceptable en reemplazo de la hidrólisis enzimática es la hidrólisis ácida de la inulina y fructanos relacionados. Un método simple, barato y rápido es la hidrólisis ácida de inulina conducida a pH 2,5 (85°C, 25 minutos) utilizando ácido cítrico o fosfórico para producir el descenso de pH (56).

El empleo de estos ácidos son compatibles con los usos agrícolas a los que están dedicados las FOS producidas: la neutralización con amoníaco en solución concentrada o con KOH, lleva a la formación de fosfatos o citratos amónicos o potásicos, nutritivos para el vegetal.

Como bien lo describe Fontana (57), el empleo de estos ácidos evitan la necesidad de desalado en el producto final, tal como sucede si se emplea HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Fontana y sus colaboradores (57) estudian detalladamente el proceso hidrolítico, en orden a minimizar la formación de subproductos indeseables, tal como el 5-hidroximetilfurfural (el cual puede ser eliminado vía adsorción sobre carbón activado).

El fraccionamiento de la masa de FOS así obtenida, en orden a separar las fracciones seleccionadas de 2-6 (<10) DP (degree of polymerization; grado de polimerización) puede llevarse a cabo ventajosamente empleando técnicas de UF/NF ya abundantemente revisadas a lo largo de esta contribución. La concentración final a través de membranas de NF (350 Da) no eliminará el fosfato de potasio o amonio producido por la neutralización ya descripta debido al fuerte rechazo de la membrana por iones distintos a los monovalentes.

La solicitud de patente presentada por Fontana et al (58) brinda una revisión ejemplar de la literatura de arte previo, fuentes vegetales comercialmente asequibles de inulina y polifruktanos (dalia, achicoria, etc.), así como una excelente investigación de los procesos de hidrólisis ácido ya revisados anteriormente.

Los fructanos del ágave (cuya hidrólisis enzimática ya ha sido referenciada (53)) también han sido objeto de estudio en lo relativo a su hidrólisis ácida para la obtención de FOS. Ávila Fernández y colaboradores (59) han investigado profundamente la hidrólisis ácida de estos polisacáridos llevada a cabo con HCl y resinas de intercambio catiónico en fase ( $H^+$ ), habiendo determinado su cinética de reacción, liberación de fructosa, grado de fructosa equivalente, etc.

Con respecto a la obtención de inulina, su purificación y caracterización, obsérvense los interesantes lineamientos publicados y fácilmente accesibles (60).

#### **4.2.2 Otros métodos de degradación de polifruktanos**

Los procesos que han sido desarrollados para la obtención de diversas oligosacarinas (radiólisis del polisacárido madre y su conversión hidrotérmica) no parecen haber sido estudiados en profundidad con el objeto de producir FOS con fines agrícolas. Esto es así en lo que consta en la experiencia de este autor, basado en la búsqueda bibliográfica científica y de patentes, de acuerdo con su mejor entender.

Respecto de los métodos radiolíticos aplicados a la depo-



limerización de inulina, se encuentran citas tempranas (61) (62) que no han encontrado su correlato en investigaciones industriales posteriores. El presente autor no ha observado constancias de aplicación de procesos Fenton con los fines citados, al menos, según su mejor saber y entender. Parece ser, entonces, que se encuentra un campo de estudios digno de ser explorado con fines industriales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) McHugh, D.H. (no date). "Chapter 2 – Production, properties and uses of alginates" in "Production and utilization of products from commercial seaweeds" (FAO Corporate Documents Repository: 37 pp).  
<http://www.fao.org/docrep/x5822e04.htm>
- 2) KIMICA Corp. (2009). Alginic acid and its derivatives; Manufacturing process (data sheet).  
[http://www.kimica-alginate.com/alginate/manufacturing\\_process.html](http://www.kimica-alginate.com/alginate/manufacturing_process.html).
- 3) Seasol®. The Seaweed Solution (no date). Biostimulants in farming (data sheet, 2 pp). [www.seasol.com.au/documents/Biostimulants-in-Farming.pdf](http://www.seasol.com.au/documents/Biostimulants-in-Farming.pdf).
- 4) IAEA TECDOC SERIES – 1745 (2014). "Radiation processed materials in products from polymers for agricultural applications": 1-12.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).
- 5) IAEA TECDOC SERIES – 1745. op. cit. Smolko, E.; Cerchietti, L.; Clozza, M.; Giardina, E.B. and others. "Radiation processing of marine algal polysaccharides as plant growth promoters": 19-25.
- 6) Sarfaraz, A.; Naeem, M.; Nasir, S.; Idress, M. and others (2011). "An evaluation of the effects of irradiated sodium alginate on the growth, physiological activities and essential oil production of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.)". J. Med. Plants Res. 5(1). 15-21.  
<http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/3F390BE15764>.

- 7) Naeem, M.; Idress, M.; Aftab, T.; Khan, M.M.A. and others (2011). "Irradiated sodium alginate improves plant growth physiological activities and active constituents in *Mentha arvensis* L." J. Appl. Pharmac. Sci. 02(05): 28-35.  
doi: 10.7324/JAPS.2012.2329.  
[http://japsonline.com/admin/php/uploads/457\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/457_pdf.pdf).
- 8) Makuuchi, K.; Yoshii, F.; Nagasawa, N.; Kume, T.; Nguyen, Q.H. (2000). "Plant growth promoter". U.S. Patent 6117815.
- 9) Kume, T.; Nagasawa, N.; Matsushashi, S.; Ishioka, N.S. and others (2000). "Radiation degradation of carbohydrates and their biological activities for plants". JAERI – conf 2000-001: 166-169.  
[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/31/049/31049881.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/31/049/31049881.pdf)
- 10) National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology (QST) (no date). "Research on biodegradable polymers; development of plant growth promoter by gamma irradiation".  
[http://www.taka.qst.go.jp/eimr\\_div/archive/2009\\_j637/theme6%20seichyou\\_e.html](http://www.taka.qst.go.jp/eimr_div/archive/2009_j637/theme6%20seichyou_e.html).
- 11) Smidsrød, O.; Haug, A.; Larsen, B. (1965). "Kinetic studies on the degradation of alginic acid by hydrogen peroxide in the presence of iron salts". Acta Chemica Scandinavica 19: 143-152.  
[http://actachemscand.org/pdf/acta\\_vol\\_19\\_p0143-0152.pdf](http://actachemscand.org/pdf/acta_vol_19_p0143-0152.pdf).
- 12) Smidsrød, O.; Haug, A.; Larsen, B. (1967). "Oxidati-

- ve-reductive depolymerization: a note on the comparison of degradation rates of different polymers by viscosity measurements". *Carbohydr. Res.* 15: 482-485.  
<http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0-S0008621500811234/first-page-pdf>.
- 13) Marritt, W. (2002). "Process for the manufacture of polyuronic acids". U.S. Pat. Appl. 2002/0016453 A1.
  - 14) Chinese Pat. Appl. CN 1544444 A (Inventors in Chinese language) (2004). "Mannuronic-acid oligosaccharides production method utilizing Fenton-type reaction" (also published as CN 1219784 C).
  - 15) Li, X.; Xu, A.; Xie, H.; Yu, W.; Xie, W.; Ma, X. (2010). "Preparation of low molecular weight alginate by hydrogen peroxide depolymerization for tissue engineering". *Carbohydr. Pol.* 79: 660-664.  
 doi: 10.1016/j.carbpol.2009.09.020.
  - 16) Díaz, V.B. (2017). *Polisacáridos industriales de interés farmacéutico* (AMV Ediciones, Madrid; I ed. ISBN 978-84-945166-6-5): 21-59.
  - 17) Farr, J.P.; Smith, W.L.; Steichen, D.S. (2003). "Bleaching agents" in "Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology".  
 doi: 10.1002/0471238961.1921182206011818.a01.pub2.
  - 18) Szilard, J.A. (1973). "Bleaching agents and techniques" (Noyes Data Corp. Park Ridge, N.J.).
  - 19) Bleaches (no date). Available from: [www.chemistryexplained.com/Ar-Bo/Bleaches.html](http://www.chemistryexplained.com/Ar-Bo/Bleaches.html).
  - 20) Hasebe, N. (1978). "Method for treating seaweed with hydrogen peroxide or hydrogen peroxide compound". U.S. Patent 4104460.

- 21) Yuan, Z.; Ni, Y.; van Heiningen, A.R.P. (1997). "Kinetics of the peracetic acid decomposition: Part II: pH effect and alkaline hydrolysis". *Can. J. Chem. Eng.* 75(1): 42-47.  
doi: 10.1002/cjce.5450750109.
- 22) 3M Company. Technical brief 70020220250, REV. 0713 b (2013). "Sanitizing LifeAssure™ BA Series Membrane Filters with Hydrogen Peroxide / Peracetic Acid Based Sanitizing Agents".  
<http://multimedia.3m.com/mws/media/504080O/lab-lifeassuretm-ba-series-chemical-sanitation.pdf>.
- 23) Wurzburg, O.B. (2006). "Modified Starches" in "Food Polysaccharides and their applications" (Stephen, A.M.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. eds. II Ed. CRC-Taylor and Francis Group): 87-118.
- 24) Rodén, L.; Baker, J.R.; Cifonelli, J.A.; Matthews, M.B. (1972). "Isolation and characterization of connective tissue polysaccharides" in *Methods in Enzymology* 28: 73-140.
- 25) Scott, J.E. (1960). "Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues". *Meth. Biochem. Anal* VIII: 145-197.
- 26) Kohn, R.; Larsen, B. (1972). "Preparation of water-soluble polyuronic acids and their calcium salts and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerization". *Acta Chem. Scand.* 26(6): 2455-2468.  
[http://actachemscand.org/pdf/acta\\_vol\\_26\\_p2455-2468.pdf](http://actachemscand.org/pdf/acta_vol_26_p2455-2468.pdf).
- 27) Guile, G.R.; Wong, S.Y.C.; Dwek, R.A. (1994).

- “Analytical and preparative separation of anionic oligosaccharides by weak anion-exchange high-performance liquid chromatography on an inert polymer column”. *Anal. Biochem.* 222(1): 231-235.  
doi: 10.1006/abio.1994.1478.
- 28) Dietrich, C.P.; Farías, G.G.M.; Deabreu, L.R.D.; Leite, E.L.; Dasilva, L.F.; Nader, H.B. (1995). “A new approach for the characterization of polysaccharides from algae – Presence of 4 main acidic polysaccharides”. Repositorio Univ. Federal de Sao Paulo (BR) (UNIFESP), OASISBR (Portal Brasileiro de Publicacoes Científicas em acceso aberto) (Elsevier, B.V.).  
doi: 10.1016/0168-9452(95)04142-H.
- 29) Linhardt, R.J.; Bazin, H.G. (no date). “Separation and purification of carbohydrates”: 67-74. doi: 10.1002/chin.200304280.  
<http://www-heparin.rpi.edu/main/files/papers/264.pdf>.
- 30) Haug, A.; Larsen, B.; Smidsrød, O. (1963). “The degradation of alginates at different pH values”. *Acta Chem. Scand.* 17(5): 1466-1468.  
[http://actachemscand.org/pdf/acta\\_vol\\_17\\_p1466-1468.pdf](http://actachemscand.org/pdf/acta_vol_17_p1466-1468.pdf).
- 31) Ballance, S.; Holtan, S.; Aarstad, O.A.; Sikorski, P. and others (2005). “Application of high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and statistical analysis to study oligosaccharide distribution – a complementary method to investigate the structure and some properties of alginates”. *J. Chromat. A* 1093(1-2): 59-68.  
doi: 10.1016/S0021-9673(05)01897-2

- 32) Rohm and Haas (2008). Amberlite™ IRA67. Industrial grade weak base anion exchanger. Product Data Sheet PDS 0226 A.  
[https://www.dow.com/assets/attachments/business/ier/ier\\_for\\_industrial\\_water\\_treatment/amberlite\\_ira67/tds/amberlite\\_ira67.pdf](https://www.dow.com/assets/attachments/business/ier/ier_for_industrial_water_treatment/amberlite_ira67/tds/amberlite_ira67.pdf).
- 33) Wang, Y-H.; Yu, G-L.; Wang, X-M.; LV, Z-H.; Zhao, X. and others (2006). "Purification and characterization of alginate lyase from marine vibrio sp. YWA". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38(9): 633-638.  
 doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00210.x  
<https://pdfs.semanticscholar.org/547d/06302a6267fe-2bf056f8540d4a4fe2885ae8.pdf>.
- 34) Yokose, T.; Nishikawa, T.; Yamamoto, Y.; Yamasaki, Y. and others (2009). "Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(2): 450-453.  
 doi: 10.1271/bbb.80692.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/2/73\\_80692/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/73/2/73_80692/_pdf).
- 35) Falkeborg, M. (2014). "Developments of innovative ingredients for improved microencapsulation". PhD thesis (Aarhus Univ., Denmark) (River Publishers, DK. ISBN 978-87-93237-51-3) (E-book).  
 doi: 10.13052/rp-9788793237513.  
[https://www.riverpublishers.com/pdf/ebook/RP\\_978-87-93237-51-3.pdf](https://www.riverpublishers.com/pdf/ebook/RP_978-87-93237-51-3.pdf).
- 36) Falkeborg, M.; Cheong, L-Z.; Gianfico, C.; Sztukiel, K.M. and others (2014). "Alginate oligosaccharides: en-

- zymatic preparation and antioxidant property evaluation". *Food Chemistry* 164: 185-194.  
doi: 10.1016/j.foodchem. 2014.05.053.  
[https://mafiadoc.com/alginate-oligosaccharides-enzymatic-preparation-and-\\_59ae54661723ddb9c5113c93.html](https://mafiadoc.com/alginate-oligosaccharides-enzymatic-preparation-and-_59ae54661723ddb9c5113c93.html).
- 37) Zhu, B.; Chen, M.; Yin, H.; Du, Y.; Ning, L. (2016). "Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lipase". *Marine Drugs* 14, 108.  
doi: 10.3390/md14060108.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/8a27/6984549e3bfc-ba69a43a008c44081e0d0796.pdf>
- 38) Shimokawa, T.; Yoshida, S.; Takeuchi, T.; Murata, K.; Ishii, T.; Kusakabe, I. (1996). "Preparation of two series of oligo-guluronic acids from sodium alginate by acid hydrolysis and enzymatic degradation". *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(9): 1532-1534.  
doi: 10.1271/bbb.60.1532.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/60/9/60\\_9\\_1532/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/60/9/60_9_1532/_pdf).
- 39) Ikeda, A.; Takemura, A.; Ono, H. (2000). "Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis". *Carbohydr. Polymers*: 42(4): 421-425.  
doi: 10.1016/S0144-8617(99)00183-6.
- 40) González, A.; Castro, J.; Vera, J.; Moenne, A. (2013). "Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism and cell division". *J. Plant Growth Regul.* 32: 443-448.  
doi: 10.1007/s00344-012-9309-1.



- [https://www.researchgate.net/profile/Alberto\\_Gonzalez29/publication/257402960\\_Seaweed\\_Oligosaccharides\\_Stimulate\\_Plant\\_Growth\\_by\\_Enhancing\\_Carbon\\_and\\_Nitrogen\\_Assimilation\\_Basal\\_Metabolism\\_and\\_Cell\\_Division/links/550c37120cf2752610954cc5.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alberto_Gonzalez29/publication/257402960_Seaweed_Oligosaccharides_Stimulate_Plant_Growth_by_Enhancing_Carbon_and_Nitrogen_Assimilation_Basal_Metabolism_and_Cell_Division/links/550c37120cf2752610954cc5.pdf).
- 41) Jeon, W.; Ryou, Y.S.; Lee, H.; Woo, H.Ch. (2013). "Depolymerization of alginate via hydrothermal treatment". 13 AIChE Annual Meeting (Conference Paper 332421).  
[www.researchgate.net/publication/267349414\\_332421;Depolymerization\\_of\\_Alginat\\_e\\_via\\_Hydrothermal;Treatment](http://www.researchgate.net/publication/267349414_332421;Depolymerization_of_Alginat_e_via_Hydrothermal;Treatment).
  - 42) Aida, T.M.; Yamagata, T.; Watanabe, M.; Smith, R.L. (2010). "Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal condition". *Carbohydr. Pol.* 80: 296-302. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.11.032.
  - 43) Meillisa, A.; Woo, H.C.; Chun, B.S. (2015). "Production of monosaccharides and bio-active compounds derived from marine polysaccharides using subcritical water hydrolysis". *Food Chem.* 171: 70-77. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.097.
  - 44) Knežević, D. (2009). "Hydrothermal conversion of biomass". Doctorate Thesis, Univ. Twente (The Netherlands) (ISBN 978-90-365-2871-9): 109-140. doi: 10.3990/1/9789036528719.
  - 45) Ruiz, H.A.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Fernandes B.D.; Vicente, A.A.; Teixeira, J.A. (2013). "Hydrothermal processing as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the bio re-

- finery concept: a review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21; 35-51.  
doi: 10.1016/j.rser.2012.11.069.
- 46) Vogel, A.I. (1989). *Textbook of Practical Organic Chemistry* (Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R. revs. Longman Sci. and Technical. V Ed. ISBN 0-582-46236-3): 97-99.
- 47) Nobre, C.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, L.R. (2015). "New trends and technological challenges in the industrial production and purification of fructo-oligosaccharides". *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition* 55(10): 1444-1455.  
doi: 10.1080/10408398.2012.697082.
- 48) Flores-Maltos, D.A.; Musatto, S.I.; Contreras-Esquivel, J.C.; Rodríguez Herrera, R. and others (2014). "Biotechnological production and application of fructooligosaccharides". *Critical Rev. Biotechnol.* 36(2): 259-267.  
doi: 10.3109/07388551.2014.953443.  
[https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/41758/1/document\\_17870\\_1.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/41758/1/document_17870_1.pdf)
- 49) Martins Meyer, T.S.; Melim Miguel, A.S.; Rodríguez Fernández, D.E.; Dellamora Ortiz, G.M. (2015). "Biotechnological production of oligosaccharides – Applications in the food industry" in "Food Production and Industry" (InTech): 25-78.  
<https://www.intechopen.com/books/food-production-and-industry/biotechnological-production-of-oligosaccharides-applications-in-the-food-industry>.

- 50) Bali, V.; Panesar, P.S.; Bera, M.B.; Panesar, R. (2013). "Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications". *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 55(11): 1475-1490.  
doi: 10.1080/10408398.2012.694084.
- 51) Lima, D.M.; Fernandes, P.; Sampaio Nascimento, D.; Figueiredo Ribeiro, R.C.L.; Aparecida de Assís, S. (2011). "Fructose syrup: a biotechnology asset". *Food technol. Biotechnol.* 49(4): 424-434.  
[http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2011/October-December/ftb\\_49-4\\_424.pdf](http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2011/October-December/ftb_49-4_424.pdf).
- 52) Urzúa Esteva, E. (2011). "Candida apicola strain and process of producing enzymes and short-chain fructooligosaccharides by enzymatic synthesis thereof". Mexican Patent MX/a/2011/009668.  
<http://ciatej.mx/patentes/33ing.pdf>.
- 53) Balar, Ch.; Nakum, A. (2011). "An efficient role of natural compounds fructooligosaccharides, steroidal saponins derived from plant in agriculture field as a plant growth promoter". World Pat. Application WO 2011154968 A2.
- 54) Leenheer, L. de; Frooninckx, K.M.J.; Heroufousse, F.A.A. (2011). "Fructooligosaccharide composition, process for its production and uses". U.S. Pat. Appl. 2011/0081449 A1.
- 55) Gote, M.; Patil, G.; Palamalai, M.; Rengarajan, S.; Avalakki, K. (2014). "Process for production of fructo-oligosaccharides". U.S. Patent 8871476 B2
- 56) Grzybowski, A.; Tiboni, M.; Passos, M.; Baldo, G.R.; Fontana, J.D. (2014). "Production of fructo-oligosac-

- charides (FOS) from inulin and applications” in “Cellulose and other naturally occurring polymers” (Fontana, J.D.; Tiboni, M.; Grzybowski, A. eds. ISBN 978-81-308-0543-6): 49-54.  
[https://www.trnres.com/ebook/uploads/fontana/T\\_1403937086Fontana6.pdf](https://www.trnres.com/ebook/uploads/fontana/T_1403937086Fontana6.pdf).
- 57) Fontana, J.D.; Grzybowski, A.; Tiboni, M.; Passos, M.(2011). “Fructo-oligosaccharide production from inulin through partial citric or phosphoric hydrolysis”. *J. Med. Food* 14(11): 1425-1430.  
doi: 10.1089/jmf.2010.0273.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39177335/FOS\\_Production\\_Through\\_Partial\\_Acid\\_Hydrolyses\\_2011.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511220003&Signature=VGzMs3k8vQ6GYKbYDfGRKJrSGfw%-3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DFructo-Oligosaccharide\\_Production\\_from\\_I.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/39177335/FOS_Production_Through_Partial_Acid_Hydrolyses_2011.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1511220003&Signature=VGzMs3k8vQ6GYKbYDfGRKJrSGfw%-3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DFructo-Oligosaccharide_Production_from_I.pdf).
- 58) Fontana, J.D.; Passos, M.; Grzybowski, A. (2011). “Process of citric or phosphoric partial hydrolysis for the obtention of fructooligosaccharides – FOS”. *Pat. Appl. WO* 2009006715 A2.
- 59) Ávila-Fernández, A.; Galicia-Lagunas, N.; Rodríguez-Alegría, M.E.; Olvera, C.; López-Munguía, A. (2011). “Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans”. *Food Chem.* 129: 380-386.  
doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.088.

- 60) Mavumengwana, V.B. (2004). "Isolation, purification and characterization of inulin and fructooligosaccharides from *Chicorium intybus* and inulinase from *Aspergillus niger*". Ms. Cs. Thesis, Rhodes University.  
<https://core.ac.uk/download/pdf/11984211.pdf>.
- 61) Bachman, S.; Zegota, H.; Antosik, B. (1973). "Radiolysis products of inulin irradiated in the solid state". Nukleonika 18: 239-246 (article in Polish). (INIS Repository Search 6(9). Ref. Number 6177372).
- 62) Tsyba, I.A.; Revina, A.A.; Shostenko, A.G. (1997). "The behavior of inulin in aqueous solutions under exposure to gamma radiation". Radiats. Biol. Radioecol. 37(2): 189-195 (article in Russian).



CAPÍTULO 5

# **MÉTODOS ANALÍTICOS DE CONTROL**





## 5.1 Introducción

En el presente capítulo se revisarán los métodos analíticos de control que permiten asegurar la constancia de composición química de la fracción oligosacarínica seleccionada, tanto en el escalado como en el seguimiento de calidad de lote a lote en la producción industrial. Como ya se ha visto, serán seleccionadas distintas fracciones oligosacarídicas en función de su bioactividad vegetal. La misma se pondrá en evidencia a través de ensayos biológicos realizados primero a pequeña escala y sobre pocos ejemplares vegetales “objetivo” para luego pasar a ensayos de campo o de mayor envergadura, incluidos trabajos en vivero, que estarán a cargo de un experto agrónomo.

Los ensayos de bioactividad a pequeña escala deben ser realizados durante las etapas de desarrollo y de producción industrial del estimulante vegetal. Con estos lineamientos solo se ha pretendido transmitir un protocolo aceptable de desarrollo, producción y control de oligosacarinas para su uso con fines agrícolas, ornamentales, etc.

### 5.1.1 Protocolo propuesto para el desarrollo, control analítico y producción química de oligosacarinas

- Elección del tipo de producto a desarrollar, en base a criterios técnicos comerciales: posibilidad de mercados, asequibilidad de materia prima y su abundancia local/regional.
- Caracterización exhaustiva de la materia prima, incluido su perfil de impurezas (en lo posible, sobre varias muestras de distintos lotes del proveedor). Especificaciones químicas de la materia prima provista por el productor. Entrega por parte del proveedor/fabricante de una carpeta de métodos analíticos de control de la materia prima.
- Búsqueda bibliográfica respecto de preparación y métodos analíticos. Determinación de la existencia de productos originales en el mercado local o extranjero.
- Si se confirma la existencia de un producto original, entonces el desarrollo será de un genérico o “copia”.
- Investigación analítica del producto original, perfil de impurezas, etc.
- Comienzo de la etapa de desarrollo preparativo del genérico sin infracción de métodos propietarios o patentados.
- Selección de distintas fracciones oligosacarínicas preparadas a escala de laboratorio.
- Screening de la bioactividad biológica vegetal sobre la especie “objetivo”.
- Selección de la fracción oligomérica de óptima respues-

ta vegetal: exhaustivo análisis químico, caracterización estructural y de impurezas.

- Producción a escala máxima de banco (bench top scale) o piloto (aprox. 100-250 g producto activo).
- Nueva confirmación de bioactividad vegetal.
- Generación de especificaciones analíticas.
- Producción experimental a escala técnica (fabricación experimental). Cambio de escala: conservación de las especificaciones ya fijadas. Observancia del patrón analítico y de bioactividad.
- Estudio de estabilidad (efecto de temperatura, luz, etc.) y de formulación (liofilizado, comprimidos, etc.).
- Registro ante la autoridad fitosanitaria correspondiente.
- Comienzo de producción a escala comercial: constancia de las especificaciones establecidas. Esporádicamente, control del patrón de bioactividad sobre el lote comercial real
- De no existir productos originales en el comercio internacional, se estará entonces frente al desarrollo de un producto innovador.
- Presentación de solicitud de patente local con extensión internacional que cubra método de producción, características del material y sus usos sobre vegetales (técnicamente, se dice que se procede a solicitar patente sobre “métodos, producto y usos”).
- La presentación de solicitud de patente debería efectuarse luego de un acabado conocimiento de la preparación a escala máxima de banco que contenga la mayor cantidad de versiones de distintos procesos innovadores

de obtención, caracterización analítica y estructural de la oligosacarina obtenida, juego de especificaciones analíticas del producto y exhaustivos ensayos de bioactividad. En la memoria de la solicitud, es obligado efectuar la presentación con una profunda revisión bibliográfica histórica del arte previo, incluida, por supuesto, la literatura de patentes.

Se habrá observado que en el segundo punto del protocolo propuesto, el autor hace referencia a la necesidad del examen analítico (incluidas las impurezas) del polisacárido / material que será utilizado como materia prima de síntesis de la oligosacarina final. Para que el método de obtención a desarrollar sea confiable y robusto, se debe partir de una calidad constante de materia prima. Esta calidad puede variar si varía el perfil de impurezas. Por ejemplo, el contenido de metales de transición (Fe, Cu, Co, Ni) debe ser cuidadosamente estudiado. Si para la producción de la futura oligosacarina, se piensa utilizar un método Fenton o radiolítico, la presencia indiscriminada o concentración variable de estos elementos metálicos originará variaciones muy importantes en los productos de depolimerización de la materia prima: los metales citados son catalizadores Fenton muy activos, influyentes también por extensión en los procesos radiolíticos; se generarán así oligosacarinas coloreadas en exceso, con altas absorbancias UV (olefinización del carbohidrato), pesos moleculares promedio y distribución molecular variable, pérdida o inconstancia de la conducta bioactiva, etc.

El técnico operante debería efectuar un cuidadoso estu-

dio de la materia prima de diferente procedencia comercial, tabulando el perfil de impurezas (metales pesados y/o de transición, polisacáridos relacionados, proteínas y ácidos nucleicos), espectrograma UV e infrarrojo, H-RMN, etc. Esto debería hacerse con muestras de varios productores y muestras varias de un mismo productor. Es fundamental que el operador esté íntimamente relacionado con el conocimiento de la materia prima, sus métodos de preparación, su origen de especie y de tejido vegetal, etc.. Solo de esta manera, a través de estos conocimientos, se podrá confeccionar un “ensayo de aptitud” de una materia prima para el proceso elegido de depolimerización.

El así denominado técnicamente “ensayo de aptitud”, consiste conceptualmente en la vinculación de una propiedad particular de la materia prima con las características finales deseadas del oligosacárido obtenido y en esto se pone en juego la profesionalidad del técnico actuante. Esta propiedad particular de la materia prima puede ser una absorbancia en el UV, el contenido de impurezas metálicas, tal como ya se ha descrito, o bien el examen de su comportamiento en el proceso sintético a pequeña escala: el orden de reacción, la constante específica de velocidad de reacción, características del producto final en lo relativo a su distribución molecular, etc. En síntesis, toda propiedad de la materia prima que pueda relacionarse con las características esperadas del oligosacárido final, tendrá valor predictivo de su aptitud para su uso en el proceso industrial.

En resumen, el experto en el arte encontrará las formas de generar un ensayo de aptitud adecuado a tales fines. Este

procedimiento es común en casi todos los campos de la Química Técnica, aun en aquellos muy disímiles entre sí. Los ensayos de aptitud se emplean, por ejemplo, en la clasificación tecnológica de petróleos con fines de predicción de un futuro procesamiento industrial (1); en el método de obtención y secado de cortezas vegetales en función del rendimiento de curtientes contenidos en ellas y su vinculación con el poder tintóreo (índice de curtición) (2)etc..

Javes (3) define perfectamente lo que se está explicando cuando declara que “Tales ensayos son frecuentemente de naturaleza empírica y algunos de ellos tienen valor solo para el fabricante como medio de control de los procesos de elaboración, mientras que otros sirven tanto al fabricante como al consumidor, de indicación de la aptitud del producto para usos determinados”.

En síntesis, son procedimientos harto conocidos y documentados, pero pocas veces puestos en práctica, al menos tanto como obra en la experiencia del presente autor.

## **5.2 Oligosacáridos de pectina y de xiloglucanos: métodos analíticos de control**

Se revisarán a continuación los principales métodos analíticos de control en la producción de oligosacáridos pécticos (oligogalacturónidos) y de xiloglucano-oligosacáridos (XGO).

Conceptualmente, los oligogalacturónidopectatos (OGP) y los xiloglucano-oligosacáridos (XGO) comparten los mis-

mos criterios de análisis que el resto de las demás oligosacarinas, y varias de las determinaciones analíticas aplicadas son también utilizadas en la caracterización de los polisacáridos utilizados como materia prima para su obtención.

Sila et al (4) proporciona una destacable revisión bibliográfica histórica, con excelente descripción de métodos analíticos aplicados a OGP. De esta publicación de consulta obligada, se puntualizan las principales determinaciones para la caracterización de OGP, también útiles en el análisis de las pectinas. Burana-Osot y col. (5) es otra publicación de elección para la consulta de metodologías analíticas. De tal forma, en la tabla 5.1 se destacan las referencias bibliográficas que suministran amplia información sobre métodos analíticos aplicados.

Cuando se referencian trabajos ya citados en capítulos anteriores, estas referencias se describirán con una “C” seguida de un número y una “R” seguida de otro dígito. Ejemplo:  $C_2R_5$  deberá entenderse como “Capítulo 2 referencia 5”.-

Tabla 5.1: OGP y XGO: métodos analíticos de control

| OLIGOSAC. | DETERMINACIÓN                      | TÉCNICA                                                                | REF.<br>BIBLIOGRAF. |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| OGP       | Ac. Galacturónico                  | Hidrólisis Enzimática +<br>TFA: HPAEC-PAD                              | C2 R14;<br>C2 R30   |
| OGP       | Ac. Galacturónico                  | m-hidroxidifenilo/SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub><br>espectrofotometría | (6)                 |
| OGP       | Metanol                            | Hidrólisis Alcalina<br>(NaOH 0,1 M): GC                                | C2 R14              |
| OGP       | Olefinización                      | Absorbancia 230-231 nm<br>(espectrofotometría)                         | C2 R14              |
| OGP       | Perfil Molecular                   | HPAEC                                                                  | C2 R30<br>C2 R13    |
| OGP       | Perfil Molecular                   | HPLC                                                                   | C2 R11              |
| OGP       | Peso Molecular                     | FAB-MS                                                                 | C2 R11              |
| OGP       | Peso Molecular                     | MS/MALDI-TOF                                                           | C2 R30              |
| XGO       | Identificación                     | FTIR                                                                   | C2 R35              |
| XGO       | Identificación                     | Reacción al I <sub>2</sub>                                             | C2 R35              |
| XGO       | Relación Azúcares<br>(Glu/Xil/Gal) | HPLC                                                                   | C2 R33              |
| XGO       | Peso Molecular                     | HPSEC                                                                  | C2 R33              |
| XGO       | Perfil Molecular                   | HPSEC                                                                  | C2 R33              |

## 5.3 Glucano-oligosacáridos y quito-oligosacáridos: métodos analíticos de control

Como en el caso anterior, se intentará tabular las principales determinaciones analíticas utilizadas en el control de la



producción de glucano-oligosacáridos (GOS) y quito-oligosacáridos (QOS).

La referenciación bibliográfica atiende a la norma ya citada en 5.2.

Tabla 5.2: GOS y QOS: métodos analíticos de control

| OLIGOSAC. | DETERMINACIÓN        | TÉCNICA                     | REF. BIBLIOGRAF.                                      |
|-----------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|
| GOS       | Caracterización      | IR                          | C3 R3;<br>C3 R5                                       |
| GOS       | Caracterización      | H-RMN/13C-RMN               | C3 R5;<br>C3 R21                                      |
| GOS       | Monosacáridos        | Gc/HPAEC-PAD                | C3 R5;<br>C3 R21                                      |
| GOS       | Peso Molecular       | Viscosimetría; HPSEC        | C3 R21                                                |
| GOS       | Perfil Molecular     | HPSEC                       | C3 R21                                                |
| QOS       | Caracterización      | FTIR/XRD/MALDI-TOF-HPLC/RSE | C3R53; C3R55;<br>(8); C3R57;<br>C3R69;C3R79;<br>C3R80 |
| QOS       | Peso Molecular       | Viscosimetría; HPSEC        | (7) (8);<br>C3R78;<br>C3R80; C3R69                    |
| QOS       | Perfil Molecular     | HPSEC                       | C3R78; C3R80;<br>C3R83;C3R69                          |
| QOS       | Oligosacáridos       | TLC                         | C3R53; C3R60;<br>(8); C3R69                           |
| QOS       | Grado de Acetilación | MALDI-TOF-MS                | C3R55; C3R57                                          |

## 5.4 Alginooligosacáridos (ALOS); fructooligosacáridos (FOS): métodos de control

Tabla 5.3 ALOS y FOS: métodos analíticos de control

| OLIGOSAC. | DETERMINACIÓN    | TÉCNICA                                                                                              | REF. BIBLIOGRAF.                                                                               |
|-----------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALOS      | Caracterización  | <sup>13</sup> C-RMN; GPC;<br>WAX-HPLC;<br>MALDI-TOF-MS;<br>TLC;<br>FTIR;<br>ESI-TOF-MS;<br>HPAEC-PAD | C4R15; C4R39;<br>C4R27;<br>C4R37; C4R43;<br>C4R36; C4R37;<br>C4R15; C4R36;<br>C4R36;<br>C4R31; |
| ALOS      | Peso Molecular   | HPSEC                                                                                                | C4 R7; C4R15                                                                                   |
| ALOS      | Perfil Molecular | HPSEC                                                                                                | C4 R7; C4R15                                                                                   |
| FOS       | Caracterización  | H-RMN;<br><sup>13</sup> C- RMN<br>(COSY/TOCSY/ROESY)<br>MS (ESI;MALDI-TOF)                           | (9) (10)                                                                                       |
| FOS       | Peso Molecular   | HPSEC                                                                                                | (9) (10)                                                                                       |
| FOS       | Perfil Molecular | HPSEC                                                                                                | (9) (10);<br>C4R54; C4R55;<br>C3R69;                                                           |

## 5.5 Métodos analíticos complementarios

Las tablas 5.1, 5.2 y 5.3 reúnen los métodos analíticos y de caracterización estructural aconsejados por el estado del arte actual. Sin embargo, el autor es consciente del hecho de que habitualmente en países en vías de desarrollo, el equi-

pamiento necesario para llevar a cabo estas metodologías analíticas no siempre está disponible, o bien las determinaciones efectuadas son demasiado caras.

Por otra parte, se pueden efectuar aproximaciones a la composición analítica empleando métodos “clásicos” antes de emplear los métodos instrumentales citados.

No obstante, es evidente que se deben contar desde el inicio de un desarrollo, con cierta instrumentación analítica inevitable, entre ellas, un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) equipado con doble detección, UV y refractométrica en orden a determinar el perfil molecular (distribución de pesos moleculares) y los pesos moleculares promedio, por técnicas de HPSEC (high performance size exclusion chromatography). Frente a estos trabajos, una bibliografía “de cabecera” es el excelente tratado escrito por Yau, Kirkland y Bly (11) denominado la “Biblia del HPSEC”. El instrumental clásico de laboratorio es, obviamente, indispensable, incluido un espectrofotómetro adecuado.

Una gran variedad de azúcares (monómeros) pueden ser valorados espectrofotométricamente, empleando reactivos de color adecuados. Estos métodos clásicos de valoración calorimétrica de hexosas, pentosas, hexosaminas, ácidos urónicos, etc., están bien descriptos en la bibliografía científica (12).

El dosaje simultáneo de ácidos nucleicos y proteínas se hace habitualmente a través de la relación de absorbancias, medidas a 260 y 280 nm (13). El método no ha perdido vigencia para la medida de la concentración de ADN y ARN, y su relación respecto de la contaminación con proteínas (14) (15), aun en presencia de insaturación en la cadena del oligómero (absorbancia interferente a 230 nm) (16).

Debe tenerse presente que en la muestra final de oligosacarina en análisis, ADN, ARN y proteínas estarán habitualmente presentes como oligonucleótidos y oligopéptidos (no así en la materia prima comercial).

Si la reacción de depolimerización produce abertura de anillo de las nucleobases (por ejemplo, procesos Fenton) (17), una opción razonable puede ser el dosaje de P total, luego de mineralizar adecuadamente la muestra: dado que el contenido de P en el ácido nucleico es 8,5-8,8%, el hallazgo del tenor de ácidos nucleicos es obvio. Convencionalmente, la evaluación se lleva a cabo a través de la medida espectrofotométrica del color desarrollado por reacción con reactivos adecuados (18), haciendo uso de los clásicos métodos de los “azules de vanadio o de molibdeno” (19): la colorimetría del fosfato con reactivo de molibdato de amonio-bencidina resulta muy adecuada a estos fines, dada su extraordinaria sensibilidad (19).

El dosaje de grupos terminales reductores (grupos aldehído terminal) puede aportar, sin duda alguna, información sumamente útil. La determinación se lleva a cabo a través de métodos volumétricos (20), siendo sencilla su realización. Conforme desciende el peso molecular medio del carbohidrato, en los puntos de escisión hidrolítica se generan grupos  $-CHO$  de carácter reductor. Por tanto, si bien el tenor de moles  $-CHO$  / mol carbohidrato es constante, la concentración de moles de  $-CHO$  / g de carbohidrato aumenta; esta propiedad puede ser empleada para una estimación del peso molecular promedio en número ( $M_N$ ) del oligosacárido en examen.

La valoración del contenido de N total puede dar infor-

mación útil si la oligosacarina contiene hexosaminas. Tal es el caso de las quito-oligosacarinas, cuyo tenor de N total puede ser interpretado en relación directa con su pureza.

La valoración del contenido de N total puede efectuarse a través del universalmente conocido método de Kjeldhal (21).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Proskuriakov, V.A.; Drabkin, A.E. (1981). *Química del Petróleo y del Gas* (MIR, Moscú, edición castellana 1984): 35-39; 73-79.
- 2) Rieche, A. (1967). *Química Orgánica Técnica: fundamentos de Química Orgánica Industrial* (Acribia, Zaragoza): 354-355; 414-415.
- 3) Javes, A.R. (1963). “Los ensayos y su significado” en “Moderna Tecnología del Petróleo: descripción amplia del estado actual de los conocimientos técnicos en esta industria” (The Institute of Petroleum, Londres; Reverte, Barcelona, NR B-864/62): 622-645.
- 4) Sila, D.N.; Van Buggenhout, S.; Duvetter, T.; Fraeye, I. and others (2009). “Pectin in Processed Fruits and Vegetales: Part II – Structure – Function Relationships”. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety* 8: 86-104.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2009.00071.x/full>.
- 5) Burana-osot, J.; Soonthornchareonnon, N.; Hosoyama, S.; Linhardt, R.J.; Toida, T. (2010). “Partial depolymerization of pectin by a photochemical reaction”. *Carb. Res.* 345: 1205-1210.  
doi: 10.1016/j.carres.2010.04.007.  
<http://www-heparin.rpi.edu/main/files/papers/505Carb%20Res%20tt10%20copy.pdf>.
- 6) Blumenkrantz, N.; Asboe-Jansen, G. (1973). “New method for quantitative determination of uronic acids”. *Anal. Biochem.* 54(2): 484-489.  
doi: 10.1016/0003-2697(73)90377-1.

- 7) Phu, D.V.; Du, B.D.; Tuan, L.N.A.; Tam, H.V.; Hien, N.Q. (2017). "Preparation and foliar application of oligochitosan-nanosilica on the enhancement of soybean seed yield". *Int. J. Env. Agric. Biotechnol.* 2(1): 421-428. doi: 10.22161/ijeab/2.1.53.  
[https://www.researchgate.net/publication/314070972\\_Preparation\\_and\\_Foliar\\_Application\\_of\\_Oligochitosan\\_-\\_Nanosilica\\_on\\_the\\_Enhancement\\_of\\_Soybean\\_Seed\\_Yield](https://www.researchgate.net/publication/314070972_Preparation_and_Foliar_Application_of_Oligochitosan_-_Nanosilica_on_the_Enhancement_of_Soybean_Seed_Yield).
- 8) Chen, M.; Zhu, X.; Li, Z.; Guo, X.; Ling, P. (2010). "Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in preparation of chitosan oligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) 5-12 containing well-distributed acetyl groups". *Int. J. Mass. Spectrom.* 290: 94-99.  
 doi: 10.1016/j.ijms.2009.12.008.  
[http://maldi.ch.pw.edu.pl/pomiary/Artykuly/Application%20of%20MALDI-ToF%20in%20preparation%20of%20chitosan%20oligosaccharides%20\(COS\)%20with%20degree%20of%20polymerization%20\(DP\)%205%E2%80%9312%20containing%20well-distributed%20acetyl%20groups.pdf](http://maldi.ch.pw.edu.pl/pomiary/Artykuly/Application%20of%20MALDI-ToF%20in%20preparation%20of%20chitosan%20oligosaccharides%20(COS)%20with%20degree%20of%20polymerization%20(DP)%205%E2%80%9312%20containing%20well-distributed%20acetyl%20groups.pdf).
- 9) Diez-Municio, M.; de las Rivas, B.; Jimeno, M.L.; Muñoz, R. and others (2013). "Enzymatic synthesis and characterization of fructo-oligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604". *Applied Env. Microbiol.* 79(13): 4129-4140.  
 doi: 10.1128/AEM.00854-13.

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697562/>.
- 10) Braz de Oliveira, A.M.; Goncalves, R.A.C.; Chierrito, T.P.C.; dos Santos, M.M. and others (2011). "Structure and degree of polymerization of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni". Food Chem. 129: 305-311.  
doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.057.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611006236>.
  - 11) Yau, W.W.; Kirkland, J.J.; Bly, D.D. (1979). "Modern size-exclusion liquid chromatography. Practice of gel permeation and gel filtration chromatography". (J. Wiley and Sons).
  - 12) Ashwell, G. (1957). "Colorimetric Analysis of Sugars" in "Methods in Enzymology", III: 73-105.  
doi: 10.1016/S0076-6879(57)03350-9.
  - 13) Warburg, O.; Christian, W. (1942). "Isolation and crystallization of enolase". Biochem. Z. 310: 384-421.
  - 14) Manchester, K.L. (1997). "When are nucleic acids not nucleic acids? Problems with estimation of nucleic acid purity by UV absorbance". Biochem. Educ. 25(4): 214-215.  
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0307-4412\(97\)00067-8/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/S0307-4412(97)00067-8/pdf).
  - 15) Held, P.G. (2001). "Nucleic acid purity assessment using A260/A280 ratios". Biotek® Application note.  
<https://www.biotek.com/resources/application-notes/nucleic-acid-purity-assessment-using-a260/a280-ratios/>.



- 16) Thermo Scientific-Nanodrops Products (2011). "Assessment of nucleic acid purity". T 042 Technical Bulletin. Nanodrop Spectrophotometers.  
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
- 17) Díaz, V.B. (2017). Polisacáridos industriales de interés farmacéutico – Aislamiento, purificación, fraccionamiento. (AMV Ediciones, Madrid. I Edición. ISBN 978-84-945166-6-5): 203-209.
- 18) AOAC XIII Ed. (1981): 365.
- 19) Vogel, A.I. (1959). Química Analítica Cualitativa. (Kapelusz, Buenos Aires) (IV Edición): 313-314.
- 20) Hodge, J.E.; Hofreiter, B.T. (1962). "Determination of reducing sugars and carbohydrates" Methods in Carbohydr. Chem. (Whistler, R.L., Wolfrom, J.S. eds. Acad. Press, N. York). I: 300-394.
- 21) Kjeldahl, J.Z. (1883). "New method for the determination of nitrogen in organic bodies". Z. Anal. Chem. 22: 366-382.



**CAPÍTULO 6**

**OTROS PROMOTORES  
Y COADYUVANTES  
DEL CRECIMIENTO VEGETAL**



## 6.1 Introducción

En la actualidad, la búsqueda de promotores del desarrollo de las plantas distintos de las oligosacarinas es constante. Tal es el caso del descubrimiento de las repraesentinas (estructuralmente relacionadas con los sesquiterpenos, aisladas del hongo *Lactarius repraesentaneus*), las cuales parecen ejercer una influencia espectacular en el desarrollo radicular de algunas especies (1) (2). Dentro de estas investigaciones, se deben mencionar los trabajos de obtención de promotores de origen sintético, tales como aquellos derivados del ácido gálico (3). Existen productos comerciales (4) que contienen hormonas vegetales (auxinas) y ácidos húmicos, con objeto de promoción del crecimiento de los cultivos y mejorador de las características del suelo.

Por otra parte, se ha comprobado la bioactividad vegetal que ejercen algunos carbohidratos no oligosacáridicos (inosina), que actúan en conjunto con aminoácidos tales como la serina (5), así como composiciones que incluyen óxidos metálicos (6); no se deben dejar de mencionar los ingentes esfuerzos que se realizan dentro del área de la Microbiolo-

gía Industrial y la Biotecnología en el estudio de la actividad que sobre el crecimiento de los vegetales ejercen ciertos agentes microbianos (7) (8) (9).

Sin embargo, los trabajos llevados a cabo sobre la investigación y preparación de promotores de crecimiento vegetal (no oligosacarínicos) a partir de desechos de biomasa producidos por la moderna agroindustria, han conducido a la obtención y formulación de excelentes productos sumamentepreciados en el mercado. En lo que sigue, se revisarán los aspectos técnicos de estos promotores, así como de otras sustancias coadyuvantes al uso de oligosacarinas y otros estimulantes de crecimiento vegetal.

## 6.2 Triacontanol

El triacontanol (n-triacontanol, 1-triacontanol,  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{28}\text{-CH}_2\text{OH}$ ) es un alcohol lineal de 30 carbonos, denominado también alcohol melísico. En sucesivos ensayos y aplicaciones ha demostrado ser un excelente promotor del crecimiento vegetal, de naturaleza no oligosacarídica.

De acuerdo con el Central Food Technological Research Institute (Mysore, India; CFTRI) (10), su obtención industrial parte de tres residuos de la producción agroindustrial: desechos de la elaboración de azúcar de caña, del té y de las cáscaras de arroz.

Este alcohol graso está contenido en la fracción cética de estos residuos. Su eficacia ha sido probada en multiplicidad de cultivos, tales como cebada, maíz, lechuga, pepino, arroz, coliflor, ají, y también papa, tomate, té, caña de azúcar, a con-

centraciones sumamente bajas, tanto como 2,5-5 mg/hectárea (11) (12). Por tanto, su uso en cultivos agrícolas y hortícolas es muy promisorio. En esta última referencia, se encuentra disponible una interesante planificación para la producción de triacontanol, que incluye instalación, equipos, potencial de mercado y costos industriales y de laboratorio.

Las ceras vegetales utilizadas para el aislamiento del triacontanol se obtienen de los “lodos de prensa” o “cachaza” (tal como se la conoce en la jerga fabril) procedentes de la clarificación de los jugos de caña de azúcar, de la cera de té procedente del procesamiento del té residual de la elaboración de té instantáneo, descafeinado, etc., y de la cera de cáscara de arroz, residuo de su molienda y extracción con solventes, con lo cual se obtienen distintos productos “crudos” con variados contenidos y rendimientos de triacontanol (10).

Este alcohol también está presente en la cera de abejas, aunque no se lo obtiene de ella en forma industrial.

Como se verá en el desarrollo de este capítulo, la obtención de triacontanol consiste básicamente en la extracción con solventes de los residuos mencionados, fraccionamiento y posterior purificación. El producto resultante, con distintos grados de pureza, se dispersa en solución acuosa. La aspersión en forma foliar de este producto adecuadamente diluído estimula el crecimiento vegetal por promoción de la fotosíntesis y actividades enzimáticas varias, incrementa la fijación de  $\text{CO}_2$  y la generación de azúcares reductores y aminoácidos estimulantes del crecimiento y rendimiento de los cultivos (12).

Este valioso producto también ha sido obtenido por mé-

todos totalmente sintéticos, métodos que probablemente estén al alcance de grandes corporaciones, por lo que en general, tal y como se ha visto, se lo obtiene por métodos de extracción. Sin embargo, es obligado mencionar la extraordinaria publicación de D.K. Parker (13), quien no solo obtiene sintéticamente triacontanol, sino que descubre un método general para la síntesis de alcoholes superiores y su aplicación a los cultivos de soja (14).

Una muy documentada revisión histórica bibliográfica sobre la conducta bioquímica y fisiológica del triacontanol, su actividad sobre otros constituyentes activos del vegetal y la respuesta de varias especies vegetales frente a la aspersión foliar con triacontanol, se encuentra disponible fácilmente (15).

Los adelantos técnicos en la obtención de triacontanol y en la estabilización de sus dispersiones acuosas permiten encontrar excelentes productos comerciales (16) aptos para dilución y aspersión foliar sobre los cultivos.

Vitazyme® (17) es un bioestimulante vegetal que declara contener 12 activadores biológicos en su composición, entre ellos, triacontanol, brassinoesteroides, extractos de algas (oligosacarinas?) y productos obtenidos de la fermentación de granos. La información suministrada en (17) sobre documentación de ensayos de eficacia agronómica de este producto transforma a esta referencia bibliográfica en objeto de estudio para el profesional interesado.



### 6.2.1 Producción de n-triacontanol

La presencia de monoalcoholes superiores en las ceras de origen natural, así como sus métodos de obtención a partir de ellas son bien conocidos desde hace tiempo.

En 1928, el gigantesco consorcio químico alemán IG Farben-industrie AG efectúa el patentamiento de un método que permite separar hidrocarburos, ácidos y alcoholes grasos de grasas y ceras naturales, tales como la grasa de lana, cera montana y cera de abejas: el método consiste en una saponificación y posterior extracción con solventes orgánicos (18) (citado por Warth, A. (19)).

Las ceras son ésteres de ácidos grasos con monoalcoholes superiores, de manera que es razonable pensar que puede encontrarse triacontanol en las ceras naturales, utilizando en particular aquellas ceras obtenidas de descartes industriales, en este caso, ceras contenidas en subproductos agroindustriales, tal como ya se ha visto.

#### 6.2.1.1 Obtención a partir de residuos de la elaboración de azúcar de caña

La fabricación de azúcar a partir de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) comienza con la molienda del vegetal, previamente cortado y desmenuzado. De la molienda (efectuada en rodillos giratorios denominados “trapiches”) se obtienen dos fracciones: el residuo vegetal o bagazo y el jugo o guarapo, obtenido por la compresión en los trapiches a enormes presiones. El guarapo es un líquido gris verdoso oscuro que contiene, además de la sacarosa disuelta, clorofila en dispersión, glucosa, levulosa, pectinas, colorantes (anto-

cianinas), proteínas y ceras. Este jugo vegetal es viscoso, sumamente turbio e infiltrable y por tal motivo, es necesario someterlo a un proceso de clarificación. Para la obtención de azúcar blanco, uno de los procesos de clarificación utilizado es el de “sulfitación” (20) (21) (22), en donde se emplean cal y  $\text{SO}_2$  como agentes químicos del proceso; la forma de aplicar estas dos sustancias es variable y el experto en el arte las modifica de acuerdo con la refractariedad de los jugos frente al proceso de clarificación (21).

Sin embargo, los adelantos tecnológicos efectuados a principios del siglo XX llevaron a implementar un proceso de clarificación basado en la alcalinización y sulfitación simultánea del jugo crudo (21).

Si la operación de sulfitación se hace por separado y antes del “encalado” (alcalinización con lechada de cal), se produce un precipitado compuesto por pectinas, ceras, grasas, minerales, etc. En estos casos, el encalado llevado a cabo sobre el jugo ya filtrado (separación del precipitado que queda retenido en el filtro prensa) vuelve a producir un precipitado coposo de  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  insoluble, que arrastra en su formación al resto de materias coloidales, tales como clorofila, ceras y colorantes (20) (21). Esto es, en el proceso de sulfitación-encalado simultáneos, se separa un solo precipitado por filtración, mientras que en la sulfitación-encalado separados puede obtenerse dos precipitados. Adoptando la definición dada por Panda (23), el “lodo de prensa” (press mud sugarcane) es “el subproducto de la fabricación del azúcar producido durante la clarificación por sulfitación del jugo de caña”. Una denominación común para estos tipos de precipitados es la de “cachaza” (20) (21).

En todo caso, estos lodos de filtro constituyen la materia prima para la extracción de triacontanol.

Los estudios tendientes a la clarificación de la composición de la cera de la caña de azúcar (que, como se vio, durante el proceso de industrialización está presente en las cachazas) han merecido atención permanente, así como los distintos procesos de aislamiento y purificación de esta cera. Balch (24) ha publicado un documentado artículo sobre los lípidos de la caña de azúcar, su recuperación industrial, su purificación, composición y utilización con diversos fines. Es excelente la descripción que hace Balch respecto de la caracterización analítica de los lípidos extraídos de cachaza y de cutícula de caña de azúcar (sea entonces, antes del procesamiento industrial), estableciendo que los mejores solventes para la extracción son los solventes clorados (24). Tal como se ha dicho, los procesos de extracción de la cera de cachaza siguen en permanente revisión (25). Sin embargo, los adelantos técnicos practicados sobre los métodos de extracción con  $\text{CO}_2$  en condiciones supercríticas están permitiendo extraer económicamente lípidos céreos a partir de biomasa variada en forma económica y compatible con el entorno ambiental (26). Se debe puntualizar que las ceras de cachaza se están aplicando a otros fines industriales, de los cuales la producción de biodiesel ocupa una atención importante (27).

La excelente Tesis de Doctorado realizada por Sin, E.H.K. (28) revisa exhaustivamente los métodos de extracción de ceras a partir de biomasa vegetal: aunque no trata específicamente sobre cera de cachaza, es tan amplia y tan detallada la información original suministrada sobre extrac-

ción con CO<sub>2</sub> supercrítico, fraccionamientos, caracterización química, cromatográfica y espectroscópica de las ceras, que su estudio obligado constituye fuente de inspiración para el técnico experto en el arte.

Chatterjee y Ghosh (29 (30) descubren métodos de preparación de triacontanol de pureza de hasta 98% y reconocen que la potencia estimuladora del crecimiento vegetal se incrementa sensiblemente cuando a los cultivos se aplican preparaciones muy puras del alcohol.

Básicamente, el proceso de producción patentado por estos investigadores se basa en los siguientes puntos fundamentales:

- Extracción de la cachaza (seca) con solventes adecuados y aislamiento de la cera cruda (evaporación del solvente).
- Disolución de la cera en alcohol y transesterificación con un alcóxido alcalino.
- Concentración del producto de reacción.
- Extracción con solvente orgánico en medio ácido. Obtención de triacontanol crudo.
- Cristalización usando solventes para obtener el alcohol semipurificado.
- Purificación a través de una etapa cromatográfica sobre gel de sílice (silicagel) usando solventes de polaridad adecuada y aislamiento posterior del triacontanol puro

Estos investigadores describen la preparación ventajosa de dispersiones estables del alcohol y su formulación adecuada con micronutrientes vegetales.

La patente china referenciada en (31) obtiene triacontanol a partir de especies vegetales del género *Euphorbia* y no de

cachaza. Sin embargo, el autor la incluye en este tratamiento porque los investigadores chinos utilizan un procedimiento cromatográfico para la obtención de triacontanol que es conceptualmente conocido y utilizado en el aislamiento y purificación de productos naturales, sumamente sencillo y escalable, pero en la actualidad escasamente utilizado, sino ignorado por completo. El método al que se hace referencia, es el mezclado íntimo del producto crudo a purificar con 3-5 veces su peso de silicagel grado cromatográfico, mezcla que se logra mejor con el “crudo” en solución orgánica y posterior eliminación del solvente.

El material seco se carga en columna cromatográfica (en ocasiones puede efectuarse sobre un embudo Büchner de paredes altas) y se procede a la elución con solventes adecuados, ya sean puros, en gradiente, etc.

Los criterios tan elegantes expresados en (31) hacen que el método (con las variaciones correspondientes) sea fuente de información relevante frente al trabajo de obtención de triacontanol a partir de lodos de prensa o cachaza.

La excelente Tesis de Maestría presentada por Swami, S. (32) presenta métodos de extracción de policosanoles (monoalcoholes parafínicos superiores de  $C_{24}$ - $C_{32}$ ) a partir de descartes de arroz (cera de cáscara), cera de abejas y otras ceras naturales y muestra muy claros procedimientos de laboratorio y de caracterización analítica de estos alcoholes en cuestión.

Panda, H. (23) presenta un método de extracción de cachaza mediante el cual se efectúa un interesante fraccionamiento inicial de las ceras obtenidas resolviéndolas en “ceras blandas” y “ceras duras”. En principio, y acorde con Pan-

da, la fracción de cera blanda es la apropiada para obtener triacontanol

En base a lo expuesto y referenciado, se pueden bosquejar distintas variaciones de los métodos de extracción de cachazas y obtención de triacontanol de acuerdo con el grado de pureza deseado del alcohol obtenido.

Indudablemente, el técnico entrenado en el arte podrá encontrar otras variaciones al método de acuerdo con la calidad de cachaza asequible, la disponibilidad de instalaciones adecuadas para el uso de unos u otros solventes orgánicos (incluido su recuperación eficiente), etc., atento siempre a la no infracción de procedimientos propietarios.

Se puede observar en la Figura 6.1 que los esteroides obtenidos pueden ser identificados a través de la característica reacción coloreada de Liebermann-Burchard (24).

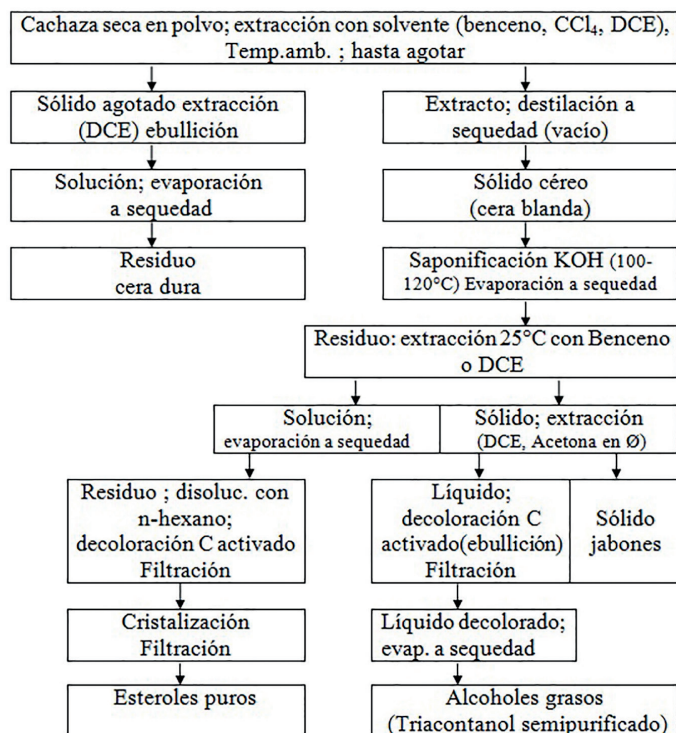
En la Figura 6.2, se presenta la opción de purificación cromatográfica sobre silicagel. El método cromatográfico presentado en (31) puede llevarse a cabo de la siguiente manera: disolver el material a cromatografiar en un solvente adecuado (por ejemplo, cloroformo), agregar la cantidad pesada de silicagel, evaporar suavemente a sequedad y cargar el sólido seco pulverulento en columna cromatográfica (o en embudo Büchner, tal como se describió) y proceder a su elución secuencial.

En este punto, debe hacerse constar lo siguiente: el método de decoloración con carbón activado puede ser reemplazado por una segunda etapa cromatográfica (de adsorción) llevada a cabo con un soporte de adsorbente polimérico (resina de adsorción). En este sentido, un producto comercial sumamente útil son las resinas de adsorción Amberli-

te® XAD-7-HP o XAD-18 (Rohm-Hass, ahora The Dow Chemical Company), frente a las cuales el alcohol graso se comporta presumiblemente indiferente.

Por otra parte, la técnica cromatográfica sobre silicagel reivindicada en (31) (realizada en columna o en un embudo Büchner) se denomina “cromatografía en columna seca” y sus detalles experimentales se pueden encontrar en la bibliografía clásica de Química Orgánica preparativa (33) (citando a (34)).

Figura 6.1: Triacantanol: método de producción tentativo (cachaza) (I)

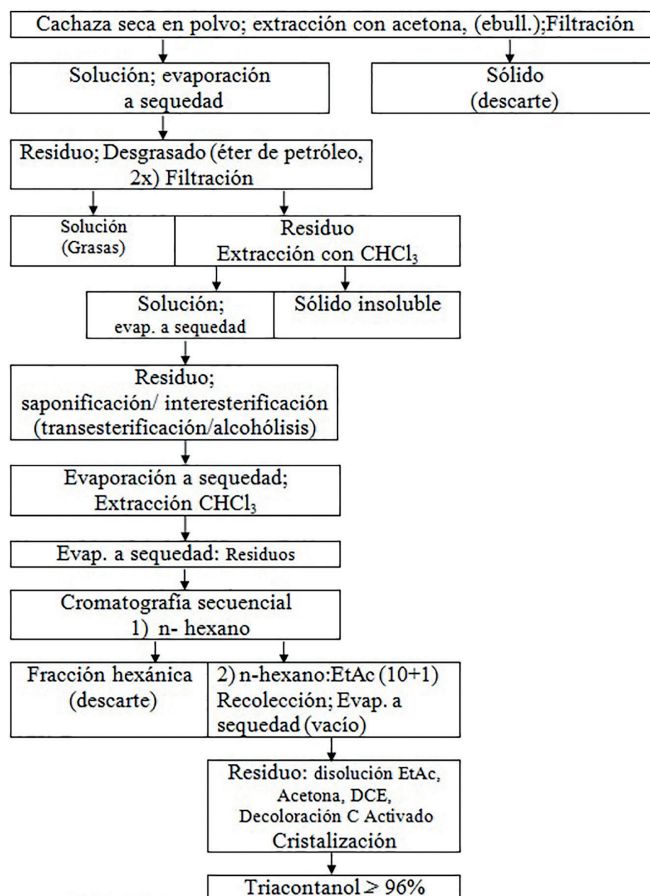


DCE= Dicloroetano

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (23) (24) (32)



Figura 6.2 Triacontanol: método  
de producción tentativo (cachaza) (II)



DCE= Dicloroetano; EtAc= Etilacetato

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (23) (24) (29) (31) (32)

### **6.2.1.2 Producción a partir de cera de cáscara de arroz**

Como se ha dicho, la cera de cáscara de arroz es una excelente fuente de suministro de triacontanol. Numerosos estudios verifican el aislamiento e identificación del triacontanol en productos “crudos” de extracción (35) (36).

En particular, la referencia (36) proporciona una interesante marcha de extracción de las cáscaras de arroz con  $\text{CO}_2$  a 600 bar (60°C), con lo cual se extrae el aceite de cáscara de arroz. La cera se obtiene por extracción con acetona de este aceite, en donde la cera queda bajo la forma de un insoluble.

La importante contribución (32) procede, de forma más sencilla, a la extracción de las cáscaras de arroz (polvo) con acetona en frío o temperatura ambiente, solvente del cual cristaliza la cera de cáscara de arroz dejando en solución el aceite propiamente dicho.

El documento patentario de Godrej y Takur (37) introduce el interesante criterio de separar los ácidos grasos como los jabones insolubles de calcio correspondientes, método también empleado por Swami (32).

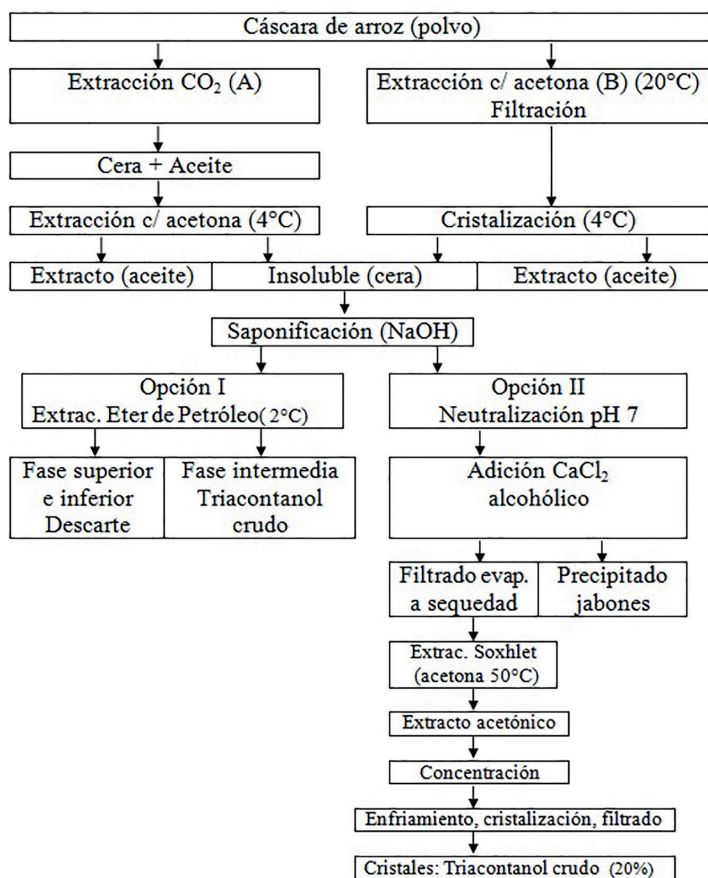
En todo caso, se obtiene un producto crudo (policosanoles crudos) que contiene aproximadamente 20% en peso de triacontanol.

A partir de este “crudo”, el producto puede ser purificado y fraccionado siguiendo los criterios expuestos en las Figuras 6.1, 6.2 y bibliografía allí referenciada.

La purificación puede realizarse, por ejemplo, a través de la implementación de la etapa cromatográfica “en columna seca”, decoloración con carbón activado o resinas de adsorción (Amberlite® XAD-7-HP), como ya se ha tratado adecuadamente.

La Figura 6.3 sugiere un método tentativo de producción a partir de cáscaras de arroz, el cual rinde triacontanol crudo, susceptible de ser purificado.

Figura 6.3 Triacontanol: método de producción tentativo (arroz)



**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (32) (36) (37)

### **6.2.1.3 Producción a partir de residuos de la industrialización del té**

La obtención de triacontanol a partir de las ceras de la planta de té (*Camelia cinensis*) es el tercer proceso industrial reconocido para tales fines. No obstante, la revisión de literatura específica no demuestra la abundancia bibliográfica que se encuentra para el caso de los residuos de prensa de caña de azúcar o del procesamiento de cáscara de arroz. Es verdad que se encuentran registros tempranos en la bibliografía respecto de la obtención de ceras de té (38): en esta patente, Strobach y Wickmann presentan un interesante y sencillo método de obtención de aroma de té con el cual se obtiene cera de té como subproducto. Se dan también las bases para la obtención de cafeína, sin excluir la obtención de cera a partir de productos descafeinados. Aunque esta bibliografía data de más de ocho décadas, suministra interesante información para la obtención de ceras de té en aras de la producción de triacontanol, tecnología aún aprovechable en países en vías de desarrollo.

Posteriormente, Augustine y Roy (39) hacen una interesante revisión histórica de la bibliografía mencionando los métodos de obtención de cafeína a partir de residuos de la industrialización del té y la producción de ceras, las cuales se obtienen como subproducto de esta operación.

Respecto de la utilización de subproductos de la planta de té a los fines de obtener ceras para producción de triacontanol, se ha demostrado que el proceso integral incluye la obtención de aceite comestible de té (en este caso, a partir de semillas) (40). Los residuos de té, ya sean provenientes de los procesos de descafeinización, té verde y té negro tie-

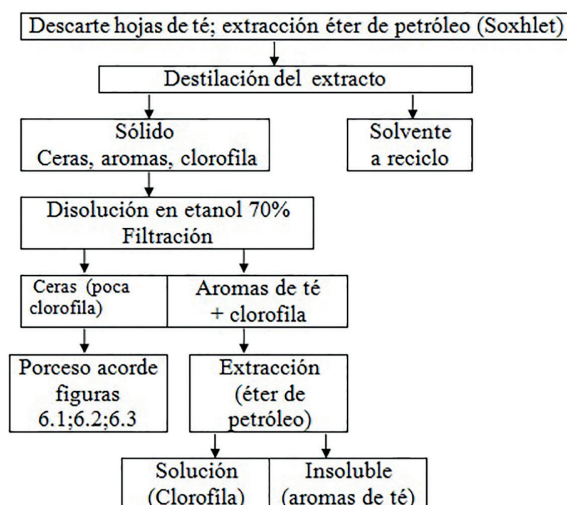
nen cantidades decrecientes de triacontanol, probablemente debido a las altas temperaturas de secado en los dos últimos casos mencionados (41).

La interesante revisión histórica bibliográfica presentada por Chowdhury et al (42) describe multiplicidad de aplicaciones técnicas para los residuos de la industrialización de la planta de té, incluida la producción de triacontanol.

La actividad fitoestimulante de los derivados de hojas de té no se circunscriben al triacontanol: se ha demostrado que los extractos de hojas de té negro (oxidado), ricos en materiales polifenólicos, poseen interesante bioactividad vegetal (43), no debida a la presencia de trazas de triacontanol, sino a la presencia de tearubiginas.

La Figura 6.4 presenta una marcha tentativa para la producción de ceras de subproductos de la industrialización de la planta de té.

Figura 6.4: Triacontanol: método de producción tentativo  
(residuos de la industrialización del té)



**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (38)

## 6.3 Residuos de café (SCG)

De acuerdo con Franca y Oliveira (44), el mayor productor de café en el mundo fue Brasil, con una producción de 2-3 millones de toneladas entre los años 2003-2007. Los desechos sólidos provenientes de su procesamiento (ya sea industrial o doméstico) están conformados por las cáscaras del grano de café, granos de café inaceptables y el producto

obtenido como remanente de la preparación de la infusión, al cual habitualmente se lo conoce como “borra de café” (molido agotado de café, spent coffee grounds, SCG).

El residuo SCG se obtiene durante la preparación de la infusión en forma domiciliaria, así como en la preparación de café soluble (café instantáneo) realizado a escala industrial. En esta última, el residuo se produce en proporción de 1,5 kg (con una humedad del 25%) por cada kg de café instantáneo, siendo el subproducto de mayor volumen producido durante la industrialización integral del grano de café (44). Esta excelente fuente bibliográfica proporciona una valiosa revisión histórica sobre procesos relativos a la industrialización del grano de café y los usos de sus subproductos, entre los que se incluye el SCG. Es obvio decir que la disposición ambiental indiscriminada produce alteraciones indeseables en el entorno y por ello, se han desarrollado variedad de aplicaciones para la utilización productiva de estos desechos, entre los que se debe priorizar el ensilado y el compostaje, sin excluir sus usos en la producción de compuestos bioactivos (por ejemplo, polifenoles), adsorbentes naturales para la remoción de metales pesados, decoloración de aguas de desecho que contienen colorantes textiles, producción de biocombustibles y materiales de construcción (45) (46). Se está realizando un esfuerzo internacional de investigación entre científicos chinos, colombianos, serbios, namibios y zimbabwenses para el empleo de compost de residuos de café en el cultivo de hongos comestibles (47).

Lamentablemente, a pesar de lo expuesto y publicado extensamente al respecto, gran parte de estos desechos agroindustriales se vuelcan indiscriminadamente sobre los

terrenos y cursos de agua, cuando serían sumamente útiles convertidos en biofertilizantes (48).

V. Moore (49) ha publicado un reporte sumamente esclarecedor sobre el costo ambiental del comercio mundial del café; dado que el café es el segundo “commodity” en el comercio mundial luego del petróleo, es evidente que su cultivo irrestricto, así como el volcado inadecuado de subproductos tiene un impacto ecológico lamentable (49). Los granjeros han sido estimulados para el reemplazo de sus métodos tradicionales de cultivo por otros más eficientes (cultivo “al sol”), lo que ha conducido a una deforestación extensa en regiones tales como Centroamérica, con el perjuicio evidente del hábitat natural de animales y otros vegetales, la polución ambiental ya mencionada y el agotamiento de los suelos (49).

Este conocimiento ha estimulado al presente autor a contribuir a la toma de conciencia sobre este gran deterioro y sufrimiento de las poblaciones rurales, estimulando, la utilización del compostaje y producción de biofertilizantes a base de SCG.

En medio de este infortunio, existen valorables iniciativas orientadas al tratamiento “in situ” de residuos agrícolas de café a través de la actividad de microorganismos naturalmente presentes en forma local, que contribuyen a salvar costos, capacitar a la población rural, mejorar los rendimientos del cultivo y el impacto ambiental a través de la producción y administración del biofertilizante así preparado (50).

No obstante, se deben tomar algunas precauciones a la hora de preparar compostajes que incluyan el SCG. Algunos aspectos beneficios del SCG son un alto tenor en N, pre-



sentando una elevada relación C/N (dado su alto contenido en ácidos húmicos), mejorador de la estructura del terreno y sumamente digerible por lombrices(51).

Pero no todos los cultivos aceptan la fertilización a base de SCG: alfalfa, rye-grass y algunos cultivos ornamentales experimentan inhibición del crecimiento por la adición de tales biofertilizantes (51).

Por tal motivo, no se aconseja utilizar más del 20% en volumen de SCG en una pila de compostaje (51) (52), y en el caso de utilizarlo directamente en suelos (SCG sin compostar), se debe aplicar en la superficie en capa delgada cubriéndola con viruta de madera o material vegetal grueso, con lo cual se inhibe la compactación del SCG (52); de lo contrario, se producirá una interferencia con el grado de humedad y el movimiento de aire en el suelo y, por lo que en la aplicación al terreno solo conviene utilizar SCG compostado (52).

Las lombrices consumen SCG, brindando un vermicompost de excelente calidad, lo que lo transforma en un método muy adecuado para la producción doméstica o rural de biofertilizantes: el vermicompost así obtenido muestra alto tenor de K, P, C y N. La presencia de SCG en el producto compostado resulta en una reducción de la relación C/N con incremento del N inorgánico (53) (probablemente debido a la conversión de las proteínas presentes en el SCG, así como de la cafeína residual).

Ya sea que el SCG se aplique tal cual o vermicompostado, se dispone en el suelo en donde actúa como remediador del terreno (enmienda), elevando los niveles del tenor de materia orgánica, aumentando los niveles de N total y orgánico y

mejorando la capacidad de retención de agua. Esto conlleva a la disminución en el uso de fertilizantes químicos.

En la práctica agrícola, cuando se resuelve utilizar SCG sin compostar, el mismo se mezcla con la tierra superficial del terreno a través de un proceso de roturación a una profundidad de aproximadamente 15-20 cm (54).

Existen productos comerciales en base a SCG, de granulometría adecuada a normas con tal fin (54).

El SCG tiene un apreciable tenor de proteínas, carbohidratos y lípidos. La composición y caracterización analítica de estos productos integrantes del SCG han sido excelentemente revisadas por Campos-Vega y colaboradores (55).

Constantemente se generan nuevos estudios sobre la utilidad agronómica del SCG en ensayos a campo que evalúan las mejoras en el crecimiento de los cultivos, remediación de los suelos e incluso su actividad en el control de malezas. Aunque el SCG contiene ácido clorogénico que tiene un efecto inhibidor del crecimiento de algunas especies vegetales (51), parece bien establecido que este efecto inhibitorio desaparece cuando el SCG se somete a compostaje (56); el tiempo de compostaje necesario para la desaparición de inhibición se acorta sensiblemente cuando se mezcla en proporciones adecuadas con restos vegetales, tales como virutas o astillas de corteza de árboles (56). Los otros residuos de la producción de café también han sido objeto de estudio agronómico: las cáscaras de grano de café adecuadamente compostadas se han utilizado para mejorar la producción sustentable de café en áreas rurales, con la consecuente disminución en el consumo de fertilizantes químicos (57).

El importante trabajo presentado por Kanyiri y Waswa (58) pone de relieve no solo los aspectos agronómicos de la utilización de residuos de café, sino también el estado actual de la situación en países en vías de desarrollo, a saber:

- Residuos de café, tal como cáscaras y pulpa, pueden ser convertidos en biofertilizantes, briquetas, etc.
- Bajo nivel de utilización de estos desechos, debido a escasa inversión, pobre demanda de cáscara y pulpa, falta de personal capacitado en el manejo integral de residuos agrícolas e indiscriminada disposición sobre el terreno.
- Deficiente difusión sobre las alternativas de utilización de estos materiales.

En la República del Congo se han llevado a cabo interesantes estudios en condiciones

sumamente controladas con el fin de establecer la viabilidad del uso de enmiendas conformadas por cáscaras y pulpa de café, sin compostar (59).

Se estableció, en base a estos trabajos, su aptitud en la remediación y mejoras de suelos arenosos presentes en climas húmedos tropicales, con excelentes resultados (59).

La notable aptitud agronómica del SCG (tal cual o compostado) no solamente puede ser aprovechada en suelos empobrecidos o poco aptos, sino también en cultivos sofisticados, tal como el desarrollo de hongos comestibles, en donde se lo utiliza como sustrato de crecimiento luego de un paso de extracción de lípidos (60). El cultivo de hortalizas, tal como lechuga, también se ve optimizado a través del uso de SCG solo o compostado (el SCG compostado demuestra mejor performance) (61).

La utilidad de otros residuos de la industrialización del café (cáscaras, pulpa) también han sido cuidadosamente revisados (62).

### **6.3.1 SCG como materia prima de fertilizantes y enmiendas**

En 1972, Goldmann (63) patenta un acondicionador de suelos compostando microbiológicamente SCG proveniente de la fabricación de café instantáneo, con aditivos tales como la sílice ( $\text{SiO}_2$  recientemente precipitado), silicato de calcio o arcilla. También se agregan otros aditivos tales como residuos de la obtención de aceite de semillas de girasol, lino, etc., e incluso lignito o agujas de pino o de coníferas. El procedimiento conduce a la obtención de enmiendas y sustratos para el cultivo ornamental en macetas.

Ferguson et al (64) utilizan el SCG (libre de aceites y grasas) como *carrier* de un polímero de urea-formaldehído, produciendo un fertilizante granulado de alto contenido de N, insoluble en agua fría.

Recientemente se ha patentado (65) un compuesto remedidor de suelos (enmiendas) aplicable al cultivo hortícola, frutícola, forestal y parquización y su método de obtención partiendo de aproximadamente 20% SCG con variedad de biomasa vegetal o de subproductos alimenticios, residuos de pino y cedro, etc., incluido barro de tratamiento de aguas cloacales.

En el año 1996-97, se introduce un método desarrollado por investigadores chinos (66) para la producción

de fertilizantes orgánicos con aptitud de mejoramiento de suelos. Este proceso incluye el criterio de introducción de materias primas de origen animal diverso (sangre, vertido de mataderos, vísceras), los cuales se someten a fermentación (compostaje microbiológico) en mezcla con materiales de origen vegetal (salvado de arroz, trigo, mazo de maíz, hojas muertas, descartes de la industrialización del té, SCG, etc.).

El mismo concepto se aplica posteriormente (67) con la inclusión de gran diversidad de componentes animales (excremento animal, descarte de mataderos, pelo de cerdo, plumas, desecho de pesquerías, etc.) y vegetales, entre los cuales se cuenta la vinaza, grano agotado de destilería, SCG, descartes vegetales y de frutas, etc., en unión a residuos de cocina domiciliaria. La mezcla se somete a fermentación controlada (compostaje microbiano), con lo cual se obtiene un fertilizante con alto contenido de N, P y K.

Iijima (68) desarrolla un método de fermentación a alta temperatura (55-80°C) utilizando bacterias y hongos termofílicos soportados sobre un *carrier* poroso tal como carbón activado, bentonita, perlitas, etc. El sustrato sometido a fermentación está conformado por mezcla de descartes de origen animal tales como los ya citados junto con residuos de origen vegetal (descartes de madera, SCG, residuos de caña de azúcar, etc.). Concluido el proceso se obtiene un fertilizante orgánico sin olor desagradable, apto para la incorporación al terreno.

## 6.4 Melazas

Como es bien sabido, el objetivo fundamental de la industrialización de la caña de azúcar (también de la remolacha azucarera) es la producción de sacarosa, comúnmente denominada azúcar comestible.

El procesamiento de la caña de azúcar produce varios subproductos, tales como el bagazo (el tejido vegetal propiamente dicho de la caña), los residuos de prensa (a partir de los cuales se obtiene la cera de caña y el triacontanol, véase 6.2), y las denominadas “melazas”, subproductos de la cristalización del azúcar.

El jugo clarificado de caña de azúcar se somete a etapas de evaporación controlada con el objeto de su concentración y la consecuente aparición de cristales al alcanzarse el grado de saturación por evaporación de agua. La masa cristalina se separa del medio líquido por métodos adecuados, dejando un material viscoso, de color oscuro, denominado genéricamente “melazas”.

En tanto la primera melaza obtenida se vuelve a concentrar para agotar cada vez más su contenido en azúcar, se obtienen diferentes productos a los que se denomina melazas “de primera” (o miel de primera) y melazas “de segunda” (o miel de segunda); como residuo de la tercera cristalización del azúcar (durante el cual se obtiene sacarosa impura), se produce la “miel de tercera” o “melaza final” o simplemente “miel residual” (69). Esta melaza final, en teoría, no permite obtener más azúcar frente a un nuevo intento de cristalización, por lo menos, a los fines técnicos, y por ello, el contenido de sacarosa en la melaza final debe ser tan bajo como sea posible (69). Las melazas finales obtenidas a partir del

procesamiento de caña de azúcar y de remolacha son distintas, y la excepcional obra de Olbrich (69) examina en profundidad las diferencias entre una y otra; se remite al lector interesado a la lectura de este libro.

La melaza final tiene poco contenido proteico y su tenor de N se debe fundamentalmente a la presencia de aminoácidos, siendo rica en potasio y fósforo (70). Sus componentes coloreados son, fundamentalmente, productos caramelizados, compuestos fenólicos (susceptibles de formar complejos de color oscuro con el hierro) y melanoidinas. En los ingenios azucareros, una parte considerable de la melaza final se destina a la producción de alcohol vía fermentación, así como también para otros productos obtenibles a través de procesos fermentativos. Dado que para los procesos de fermentación, la melaza debe tener un contenido mayor de sacarosa que aquel que se obtiene en una melaza final, el proceso de producción de azúcar se ha simplificado sensiblemente, ya que en esos casos no es necesario agotar al extremo la melaza final (71). Un exhaustivo análisis químico de melazas de distinta procedencia se encuentra disponible en la literatura referenciada (69) (70).

La melaza reconoce multiplicidad de usos, tal como materia prima para la producción de bioetanol por fermentación, aminoácidos, ácidos orgánicos, *starter* (inóculo) de levadura para la producción de levadura de panificación (previo enriquecimiento con biotina), etc. (70) (71).

Sin embargo, un uso relevante de la melaza final consiste en su administración a vegetales, diluida solamente en agua o formando parte de otras preparaciones fertilizantes.

Acorde con la información comercial provista por empre-

sas productoras de melazas destinadas a fertilización (72), este material provee una interesante cantidad de carbohidratos (44-52% P/V), así como micronutrientes fundamentales para el crecimiento y metabolismo de las plantas.

Su capacidad de complejación con iones metálicos (formación de quelatos) permite hacer a estos iones más biodisponibles fijándolos al suelo e impidiendo su lixiviación (72). De hecho, es uno de los mejores *carriers* de hierro reconocido por su origen natural, no sintético, que permite su rápida absorción por parte del vegetal y estimula el crecimiento de microorganismos benéficos del suelo (73).

Dado que, en promedio, 1 tonelada de caña de azúcar genera 23 litros de melaza (74), es natural que la utilización de estas “mieles finales” cobre interés en la aplicación a los propios cultivos de caña de azúcar, junto con otros subproductos, tales como el bagazo y lodos de filtro prensa, lo cual permite el descenso de la cantidad de fertilizantes químicos utilizados.

La bioconversión de melazas destinadas a la obtención de ácidos orgánicos con capacidad complejante de iones metálicos, ha permitido no solo reducir el uso de fertilizantes químicos, sino también minimizar la contaminación de cursos de agua con fertilizantes nitrogenados y promover la fertilización de cultivos y especies arbóreas (75).

## 6.5 Vinazas

Las vinazas son subproductos de la industrialización de la caña de azúcar. Son líquidos oscuros, viscosas, de olor desagradable, con alto contenido de sustancias orgánicas y, por



tanto, con muy altos valores de DBO y DQO (demandas bioquímica y química de oxígeno, respectivamente). Esto hace que su volcado irrestricto e inadecuado al medio ambiente genere lamentables impactos ecológicos. Esta situación es la que ha promovido los estudios industriales para la conversión de vinazas a productos útiles y a la vez rentables.

De acuerdo con Olbrich (69), parece necesario distinguir entre dos tipos diferentes de vinazas: aquellas resultantes de las últimas etapas de fabricación de azúcar y las otras obtenidas como residuo de la producción de alcohol por fermentación de las melazas. Efectivamente, la fermentación de melazas por adición de levaduras convierte la mayor parte de los azúcares disponibles en ellas (sacarosa, fructosa, dextrosa, etc.) en etanol, el cual es aislado del seno por métodos de destilación. El seno líquido agotado de alcohol es la así denominada “vinaza de alcoholera o de destilería”. Este material también recibe la denominación fabril de “fondo de calderete”, “barros de destilación” o “aguas agotadas de destilería”.

Estas vinazas de alcoholera son los productos principales de la industrialización de las melazas y a las que se dedicará el presente texto. En el proceso de obtención de alcohol, la calefacción con la destilación concomitante sigue hasta que el seno en destilación queda “agotado” de etanol. El residuo descargado del calderete de destilación es la vinaza de alcoholera propiamente dicha. En la práctica fabril, los sucesivos lotes de vinaza se reúnen y vuelven a destilar con el objeto de recuperar tanto alcohol como sea posible.

Como resultado de las etapas de calefacción (incluida la etapa de evaporación para incrementar su concentración de

sólidos), el material sufre reacciones de condensación. Este producto “condensado” y concentrado en sólidos, se denominan “melazas solubles condensadas” (condensed molasses solubles, CMS) (76), material que es utilizado como un fertilizante NP, tal cual o mezclado con vinaza propiamente dicha sin condensar, aplicándose al vegetal por vía foliar o asperjando directamente sobre el terreno, y constituye un excelente reemplazo de la utilización agrícola de melaza, la cual es comparativamente más cara (76).

Cuando es necesario aumentar el contenido de N en la vinaza, se agregan hidrolizados proteicos, por ejemplo, de pescado (77), dado que la vinaza contiene niveles bajos de N, mayormente formando parte de sólidos insolubles en suspensión (78).

Olbrich (69), así como Rodrigues Reis y Hu (78), proveen en sus reportes un extenso análisis químico cuantitativo de las vinazas, cuya composición depende en gran medida de su origen y procedencia. Como ya se ha comentado, las vinazas son ricas en compuestos fenólicos y melanoidinas y compuestos caramelizados: durante las etapa de calefacción, las reacciones de condensación conducen a la formación de melanoidinas, uno de los productos finales de las reacciones de Maillard. Los colorantes fenólicos son productos condensados de los grupos cinámico y benzoico, precursores de los flavonoides (79).

El empleo de vinazas en fertirrigación es uno de los usos sustentables económicamente y compatibles con el medio ambiente cuando la fertilización se efectúa sobre bases científicas que incluyen el conocimiento del suelo por fertilizar y la composición de la vinaza que se utilizará con este fin.

La correcta aplicación no afecta las propiedades del suelo y no contamina los cursos de agua subterránea (78); una orientación del uso adecuado de vinaza para estos fines es el empleo de hasta 300.000 litros de la misma / hectárea (3-4 kg  $K^+$ /m<sup>3</sup>).

Repetidamente se ha advertido sobre los aspectos adversos de la disposición de vinazas sobre el terreno, efectuada sin una base científica, por lo cual se ha propuesto una regulación oficial para el uso de vinazas con fines fertilizantes en los países que la generan. Estas regulaciones incluyen, las dosis recomendadas de sales y cationes ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ), compuestos polifenólicos y sustancias orgánicas (80).

Vadivel y colaboradores (81), así como Chhaya y Kumar (82), han proporcionado excelentes indicaciones tabuladas sobre la práctica de adición de vinazas aplicadas al terreno o sobre los cultivos, relacionando los lugares geográficos, especie vegetal y prácticas recomendadas, así como una interesante comparación entre las modalidades de irrigación y fertirrigación, brindando datos que permiten asegurar la fertilización a través de distintas variables (distribución de N en el suelo, biodisponibilidad al vegetal, etc). Esto conlleva la disminución en el consumo de fertilizantes químicos y de agua potable, así como un descenso en la contaminación de aguas freáticas y superficiales. Del examen detallado de estas dos últimas referencias bibliográficas se puede puntualizar:

Incremento de rendimientos a través de la fertilización sobre bases científicas con vinazas: por ejemplo, en Cuba, se han fertilizado cultivos de caña de azúcar a una tasa de 300 m<sup>3</sup>/ha en dilución 1:5 asociada a fertilización NPK, habiéndose obtenido un incremento del 64% en el rendimiento.

- Incremento de la población microbiana del suelo: la tasa de descomposición de materia orgánica resulta ser hasta 5 veces superior a la obtenida con la adición de excremento de ganado.
- Incremento del estado de agregación del suelo, modificando su porosidad y generando corpúsculos de agregación con altos contenidos de N y C (mayor tenor de materia orgánica en el terreno). Esto es particularmente importante en terrenos calcáreo-arenosos, en donde se verifica aumento del tenor de materia orgánica (en particular, ácidos húmicos).
- Aplicada en forma conjunta a fosfato mineral, aumenta la biodisponibilidad del P por parte del vegetal, con lo cual se logra un descenso en el consumo de fertilizantes fosfatados.
- Su correcta aplicación no actúa contaminando aguas subterráneas o cursos hídricos (hasta 500 m<sup>3</sup>/ha), aunque en épocas lluviosas no debería efectuarse su disposición bajo la forma de fertirrigación o directamente sobre el terreno.

Dado que como orientación general puede tomarse la producción de vinaza de alcoholera como 10-15 litros / litro de etanol producido, es natural que se hayan desarrollado criterios tecnológicos para el tratamiento de las vinazas concebidas como efluentes indeseables, tales como procesos aeróbicos, anaeróbicos, oxidativos, electroquímicos (83), biodigestión para la obtención de CH<sub>4</sub> y/o combustión, incineración, etc., alentando las investigaciones técnicas para la concentración de vinazas con el objeto de disminuir su

volumen y aumentar su tenor de sólidos (vinaza tal cual, 5-10% P/V) (84).

Se encuentran publicados los avances producidos en la tecnología de procesos fermentativos con el objeto de disminuir la cantidad de vinaza producida por litro de alcohol, incluidos estudios sobre técnicas de evaporación al vacío y de separación por membranas (ósmosis inversa) (84).

En particular, la recirculación de vinaza a la etapa de fermentación de melaza se muestra como un avance promisorio (85). Esta referencia bibliográfica presenta una excelente revisión histórica del uso de vinaza en procesos de recirculación.

Se encuentran documentadas las bases teóricas y experimentales de funcionamiento de una planta piloto industrial para el tratamiento de vinazas y su posterior conversión a alimento para ganado, incluido el proceso de cambio de escala (86).

Las vinazas no se producen solamente por la industrialización de la caña de azúcar y la remolacha azucarera, sino que también se pueden obtener del procesamiento de otras especies vegetales. Al respecto, se encuentra disponible una excelente caracterización analítica de las vinazas de trigo, cebada, maíz, celulósicas, sorgo dulce y ágave (generación de tequila) (83).

Román y sus colaboradores (87) han efectuado un descubrimiento relevante, tal como la conversión de vinazas a ácidos húmicos y fúlvicos a través de la acción de un consorcio multienzimático, así como el desarrollo de la química e ingeniería de base de una planta industrial de este fertilizante líquido, incluyendo la caracterización analítica y normalización de las vinazas de partida.

Se han llevado a cabo muy interesantes desarrollos referidos a la caracterización de los polímeros constituyentes de las vinazas (espectroscopía IR), poder quelante de cationes metálicos, caracterización de pesos moleculares de los constituyentes y la transformación industrial de vinazas normalizadas (88). Estas investigaciones, (llevadas a cabo por Kimel Aditivos, S.L.) y sus productos resultantes, han sido adecuadamente registrados con fines de patentamiento (89). También se han desarrollado formulaciones fertilizantes a base de vinazas concentradas por evaporación, mezcladas con las tortas de filtración obtenidas en los procesos de elaboración de azúcar de caña, con adición regulada de elementos fertilizantes (90).

La vinaza puede ser utilizada como medio de cultivo en producción biotecnológica de hidrógeno y también para la obtención de ácidos grasos volátiles a través de la acción de bacterias anaeróbicas (91).

Las vinazas de alcoholera, en tanto que fertilizantes, se han aplicado sobre los propios cultivos de caña de azúcar y sobre otros cultivos y al respecto existen detallados estudios que han permitido llegar a importantes conclusiones, a saber:

- La aplicación de vinaza sobre cultivos de caña de azúcar ( $100\text{--}400\text{ m}^3/\text{ha}$ ), estimula el sistema radicular y la emisión de brotes (92).
- Las vinazas presentan un desbalance de nutrientes, por lo que se deben complementar con fertilizantes químicos (sobre todo, nitrogenados, pero también potásicos). En suelos fertilizados con vinaza, se registra mejor respuesta a la adición de fertilizantes nitrogenados (92).

- La vinaza aplicada racionalmente satisface las necesidades de N, K y S, reduciendo los costos de fertilizantes químicos (92) (93).
- El efecto de la adición de vinaza con cloruro de potasio sobre suelos de distinta naturaleza arcillosa demuestra que puede disponerse racionalmente sobre los terrenos de la plantación en forma inocua (93).
- La aplicación sobre otras plantaciones, por ejemplo, maíz, ha revelado incrementos en el rendimiento de hasta 65%, en dosis de 100 m<sup>3</sup>/ha (94).
- Las investigaciones llevadas a cabo por doquier permiten documentar los efectos benéficos de la adición realizada en forma científica sobre terrenos y plantaciones (95).

### **6.5.1 Consideraciones sobre los procesos de concentración de vinazas de alcoholera**

En el desarrollo del presente capítulo ha quedado establecido que la concentración de sólidos en las vinazas de alcoholera raramente sobrepasa una concentración del 10% P/V, y por ello su uso como fertilizante obliga a la disposición sobre el terreno de grandes volúmenes de líquido acuoso, con lo cual el lavado de los minerales del suelo se maximiza facilitándose la penetración del material en las capas freáticas y cursos hídricos con la contaminación asociada. Las vinazas, por otra parte, pueden contener trazas de metales pesados e inclusive arsénico, cuya acumulación en el terreno es sumamente indeseable, tanto en lo que respecta a

la contaminación ambiental como a su incorporación a los tejidos vegetales propios de la especie cultivada. La diseminación de estos elementos químicos también significa una pérdida económica, dado que los mismos presentan diversa aplicación industrial en caso de ser recuperados. Por lo demás, debe considerarse que los enormes volúmenes de agua diseminados sobre el campo de cultivo, es agua malgastada que se debería poder recuperar técnicamente y reciclar en el proceso de biorefinerías, con el objeto de optimizar costos y rentabilidad.

En este sentido, la concentración industrial de vinazas de destilación de alcohol, se produce básicamente a través de dos alternativas, la evaporación (concentración térmica) y la concentración a través del uso de tecnologías de separación por membranas, a saber, ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), ósmosis inversa (reverse osmosis, RO).

#### **6.5.1.1 Concentración por evaporación**

La concentración de vinazas por evaporación térmica del agua constituyente fue estudiada en profundidad en épocas recientes (96) a través de métodos de secado empleando unidades de película descendente (“falling films”), con lo cual se logra una concentración de sólidos de hasta 75%.

La posterior combustión del material concentrado permite la recuperación del potasio contenido en la vinaza original, bajo la forma de  $K_2SO_4$ , siendo utilizado con fines de fertilización agrícola. Sin embargo, se debe tener en cuenta que esto no soluciona el problema de la necesidad de eliminación de metales pesados en la vinaza inicial (los que se van a encontrar en el  $K_2SO_4$  producido); el agua recuperada



por evaporación en la película descendente contiene en disolución materiales volátiles de distinta naturaleza, lo cual obliga a su purificación post-evaporación (purificación para la cual los métodos de RO pueden representar una solución económica, versátil, elegante y adaptable a toda escala).

Por cierto, al respecto se debe hacer notar que los componentes volátiles de la vinaza se encuentran perfectamente caracterizados, cualitativa y cuantitativamente: alcohol fenil etílico, furfural, pentadecanol, hexadecanol, láctico, acético, fórmico, acetaldehído (en el concentrado permanecen polialcoholes derivados de monosacáridos, sacarosa y ácido quínico).

Entre los materiales volátiles también se encuentran ésteres etílicos de ácidos grasos y cera de vinaza (cuyo contenido en ácidos grasos no esterificados y esterificados se encuentra perfectamente caracterizado) (97) (98).

Lo expuesto ha alentado las investigaciones técnicas sobre la concentración de vinazas, no solo por evaporación al vacío, sino también a través de métodos de UF, NF y RO, lo que permite disminuir su volumen y aumentar su concentración (84). De la misma forma, se han estudiado diversos adelantos en procesos fermentativos con el objeto de disminuir la cantidad de vinaza producida por litro de alcohol o bien el empleo de vinaza como sustrato para la bioproducción de  $\text{CH}_4$ , posteriormente utilizado como combustible.

### **6.5.1.2 Concentración a través de métodos de UF, NF, RO**

Como se ha establecido, las vinazas suelen contener metales pesados y otros elementos (Cu, Pb, Zn, Cd, Hg, As) que pueden contaminar suelos por la aplicación repetida de la

misma como fertilizante (99). La vinaza concentrada a 60° Brix (60-65% sólidos P/P) tiene un tenor de 4-8% de proteínas, 35-42% de carbohidratos (5% de azúcares; 3,3% de polisacáridos) y otros materiales no dializables, entre los que se encuentran polímeros y pigmentos de alto peso molecular (superior a los 12 kDa), responsables del color oscuro del material (99).

Estos pigmentos oscuros son melanoidinas, polímeros heterogéneos de alto peso molecular (coloides altamente dispersos, ácidos, negativamente cargados, de pesos moleculares comprendidos entre 5000-40000 Da) generados cuando carbohidratos de bajo peso molecular o compuestos fenólicos (taninos, ácidos húmicos) se combinan con los aminoácidos de las proteínas vía reacción de Maillard (100) (101). Precisamente, las melanoidinas son las responsables de fitotoxicidad sobre los cultivos vegetales y sobre micro y macroorganismos acuáticos, y son recalcitrantes a la degradación microbiana, aún en plantas de tratamiento (101). En la materia seca de las vinazas se ha determinado que entre 79-92% de la misma está constituida por una fracción de carbono orgánico soluble, revelando la presencia de carbohidratos y de sustancias fúlvicosimilares (102), siendo la celulosa y la hemicelulosa constituyentes de los citados carbohidratos (102).

Se ha llevado a cabo la eliminación de estos materiales de alto peso molecular con el uso de floculantes naturales de bajo peso molecular, relacionados con el tanino, aunque la persistente presencia de productos tóxicos en el seno líquido obliga a un posterior tratamiento foto-Fenton (UV) activado con  $\text{TiO}_2$  (103).

La aplicación de tecnologías de separación por membranas tiene entonces por objeto producir una concentración de las vinazas, generando un permeato de gran volumen, el cual necesita ser “pulido” a través de un adecuado paso de NF/RO (104) (105).

Las posibles combinaciones de las diferentes etapas de UF, NF y RO han sido estudiadas en detalle por diferentes investigadores, pero deben ser ensayadas en el lugar de generación de la vinaza, para cada tipo de vinaza producida en el proceso fabril (o bien para una vinaza “promedio”) y con el objeto de producción de un fertilizante inocuo para el terreno, con recuperación de enormes volúmenes de agua apta para ser reutilizada en el proceso. En este sentido, la revisión de bibliografía técnica revela las condiciones experimentales más adecuadas para cada tipo de fraccionamiento deseado.

Covallier y colaboradores (106) detallan el uso de RO para el tratamiento de vinazas, con coeficientes de rechazo superiores al 85%: la adecuada selección del pH del medio líquido asegura la recuperación de los productos volátiles anteriormente detallados.

Estos investigadores proponen el uso del interesante doble paso de RO (en general, aplicado a cualquier valor de peso molecular de corte) para lograr mejores valores de retención (106). No obstante, es razonable esperar que la utilización de una de estas tecnologías en particular no sea apta para la resolución satisfactoria de este tipo de procesos.

El criterio bien establecido de los “dobles pasos” también debe ser tenido en cuenta y conscientemente estudiado para cada sustrato en particular.

La combinación adecuada de métodos de UF, NF y RO

ha sido excelentemente desarrollada por de Moraes Santos Gomex y colaboradores (107), con una detallada descripción de condiciones experimentales y valores de pesos moleculares de corte (MW cut-off).

Este grupo de investigación emplea una “cascada” o “tren” de ultrafiltración a través de valores de cut-off de 100 kDa y 1 kDa, y NF a través de membranas de cut-off de 300-500 Da (107).

Murthy y Chaudhary (108) efectuaron un excelente tratamiento de los procesos combinados de UF y RO, habiendo obtenido eficiencias de rechazo de hasta el 99% de sólidos disueltos,  $\text{SO}_4^{=}$ ,  $\text{K}^+$ , DBO y DQO; lamentablemente, no se hace mención expresa de los valores utilizados de pesos moleculares de corte.

Una interesante tecnología se encuentra disponible a través de New Logic Research Inc. (109), la cual minimiza los indeseables efectos del “fouling” de las membranas a través de un movimiento vibratorio oscilante rápido de la unidad de filtración, con la cual se dificulta la deposición de coloide sobre la superficie filtrante. Se aseguran así altos valores de flujo para altos valores de retención de solutos, tanto para vinazas previamente digeridas como sin digerir. La tecnología USEP se utiliza en el tratamiento de la vinaza generada, así como la filtración antes del proceso de destilación (con lo cual se obvia la generación de la vinaza característica): la filtración previa a la etapa de destilación facilita la misma sobre el permeato libre de sólidos (109).

Breda, Lorain y colaboradores (110) ensayan el empleo de un tren de UF (300 kDa) – NF (500 y 1500 Da) en

vinazas de metanación; el estudio revela que, a flujos bajos, el permeato de nanofiltro es apto para su volcado a cursos naturales de agua, cumpliendo las normas en vigencia para valores de DBO, DQO y coloración.

En lo relativo a pulido final en aguas condensadas de evaporadores, la etapa de NF es obligada en orden a eliminar compuestos volátiles arrastrados por la operación de destilación y presentes en el agua condensada. Habitualmente, el condensado sale a temperatura elevada y, por tanto, en los casos en que el mismo se puede reciclar en caliente, se han desarrollado membranas en arrollamiento espiral aptas para operación continua a temperatura de hasta 90°C (111).

En este punto, parece importante remarcar lo siguiente: la tasa de decoloración (lo que es equivalente al grado de retención de melanoidinas), se puede mejorar sensiblemente implementando el denominado “doble paso de ultrafiltración”, como ya se ha documentado (106). En particular, el doble paso consiste en hacer pasar dos veces la solución por la misma membrana. Efectuado el primer pasaje de la solución a través de la membrana, el permeato obtenido se vuelve a ultrafiltrar a través de la misma. Con esta operación, se pueden lograr importantes reducciones en el índice de color, que puede alcanzar hasta el 85-90%.

El doble paso de UF se puede realizar cambiando el cut-off de la segunda membrana, habitualmente menor que el peso molecular de corte de la primera. Se obtiene así un segundo permeato más decolorado aún.

La tercera etapa obligada es la implementación de un paso de NF (100-350 Da), con lo cual se facilita el permeado de

agua y sales inorgánicas (monovalentes, por ejemplo, cloruro), quedando retenidos macrosolutos (en este caso, restos de melanoidinas). A valores altos de peso molecular de corte (cut-off), por ejemplo, superiores a 5 kDa, es habitual en la práctica técnica concentrar la solución coloreada al máximo (por ejemplo, 5-10% del volumen inicial) sin proceder a una etapa de diafiltración subsiguiente, dado que este procedimiento habitualmente tiende a hacer permear colorantes que hasta el inicio de la diálisis habían quedado retenidos (112).

El empleo de resinas adsorbentes con el objeto de decoloración de estos materiales también representa una serie muy grande de posibilidades, bien utilizadas por el técnico formado en el arte: su amplio campo de aplicación cubre en igual medida la decoloración de aguas, soluciones polisacáridicas y proteicas, aminoácidos, azúcares sencillos, antibióticos, etc.

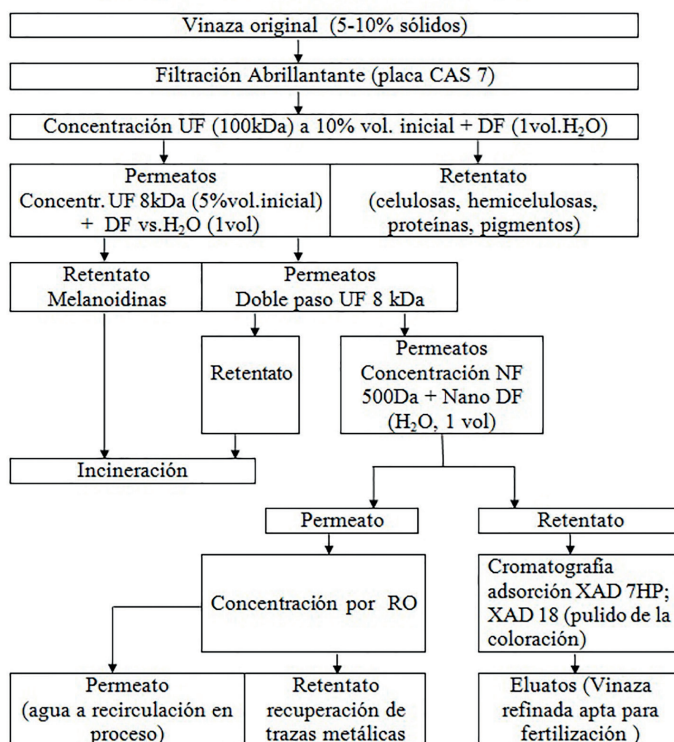
La aplicación de las resinas adsorbentes en los distintos procesos de la industria de alimentos se encuentra extensamente detallada en (113) (114). Al respecto, la resina Amberlite™ XAD 761 presenta óptimas propiedades de decoloración de soluciones acuosas, así como las Amberlite™ XAD 7 HP y XAD 18 (114); la interesante resina Amberlite™ XAD 1180 N presenta adsorción de solutos de peso molecular superior a 1000 Da.

Dichas resinas se regeneran en columna procediendo a la elución con etanol puro o en solución acuosa, acetona o bien solución acuosa 1 M de NaOH (115).

La Figura 6.5 propone un procedimiento tentativo para la producción de fertilizantes a base de vinazas de alcoholera,

con especial énfasis en la utilización de técnicas de ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis reversa y etapas de decoloración (pulido) a través del uso de adsorbentes poliméricos.

**Figura 6.5: Vinazas: método de producción tentativo de fertilizantes por tecnologías de UF-NF-RO/ resinas de adsorción**



**DF: Diafiltración**

**Fuente:** Elaboración propia, en base a referencias (106) (107) (108) (111) (112) (113) (114) (115) (116)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Hirota, M.; Shimizu, Y.; Kamo, T.; Makabe, H.; Shibata, H. (2003). "New plant growth promoters, repraesentins A, B and C from *Lactarius repraesentaneus*". Biosci. Biotech. and Biochem. 67(7): 1597-1600.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/c1b5/63a24bf46977a8f81ebaa06a76f0cef55277.pdf>.
- 2) Kashiwabara, M.; Kamo, T.; Shibata, H.; Hiroto, M. (2005). "New plant promoters from *Lactarius repraesentaneus*". Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni kansuru Toronkai Koen Yoen Yoshishu 49: 308-310 (in Japanese).
- 3) Negi, A.S.; Darokar, M.P.; Chattopadhyay, S.K.; Garg, A. and others (2005). "Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid". Bioorganic and Medicinal Chem. Letters 15(4): 1243-1247.  
 doi: 10.1016/j.bmcl.2004.11.079.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46559254/Synthesis\\_of\\_a\\_Novel\\_Plant\\_Growth\\_Promot20160616-1345-cyz614.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53U-L3A&Expires=1513172051&Signature=5v1BXhc-DUiKYAio%2BsGZxD3L5AWg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DSynthesis\\_of\\_a\\_novel\\_plant\\_growth\\_promot.pdf](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/46559254/Synthesis_of_a_Novel_Plant_Growth_Promot20160616-1345-cyz614.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53U-L3A&Expires=1513172051&Signature=5v1BXhc-DUiKYAio%2BsGZxD3L5AWg%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DSynthesis_of_a_novel_plant_growth_promot.pdf).
- 4) Ecochem. Humic Plus. The Perfect Solution. Organic Natural Plant Food and Root Growth Promoter (technical data shett) (downloaded on Jan. 2, 2008)  
[www.ecochem.com/t\\_humic\\_acid.html](http://www.ecochem.com/t_humic_acid.html).
- 5) Kurauchi, M.; Takeuchi, M.; Miyazawa, Y.; Sato, H.



- (2002). "Growth promoters for gramineous plant". World Patent WO/2002/089580.
- 6) Mori, S.; Sasamoto, H.; Yasui, M. (2007). "Iron (I) oxide-containing composition and plant growth promoter comprising the same". World Patent WO/2007/013217.
  - 7) Matiru, V.N.; Dakora, F.D. (2006). "Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops". *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (1), pp. 1-7.  
<https://ospace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/3485/1/jb04001.pdf>.
  - 8) Tenzer, A.I. (1987). "Microbial plant growth promoter and yield enhancer". World Patent WO/1987/002659.
  - 9) Chakraborty, U.; Chakraborty, B.N.; Tongden, C.; Chowdhury, P.R.; Basnet, M. (2004). "Assessment of tea rhizosphere microorganisms as plant growth promoters". *TEA* 25(2): 38-47.
  - 10) Central Food Technological Research Institute, CFTRI (no date). "n-Triacontanol (a plant growth promoter). Mysore – 570020.  
[www.cftri.com/technologies/SFS/triacontanol.pdf](http://www.cftri.com/technologies/SFS/triacontanol.pdf).
  - 11) Plant Growth Promoter n-Triacontanol (no date).  
[www.nsicpartners.com/Schemes/documents/projprofiles/Plant%20Growth%20Promoter.pdf](http://www.nsicpartners.com/Schemes/documents/projprofiles/Plant%20Growth%20Promoter.pdf).
  - 12) n-Triacontanol. Process from tea waste, application, project from sugar mud, product, machinery, company profiles, reports (downloaded 2017-5-19).  
[www.primaryinfo.com/projects/n-triacontanols.htm](http://www.primaryinfo.com/projects/n-triacontanols.htm).
  - 13) Parker, D.K. (1983). "Methods for synthesis of long-chain alcohols". U.S. Patent 4367346.

- 14) Nickey, D.O.; Parker, D.K. (1984). "Method for the application to soybeans to achieve a substantial increase in yield". U.S. Patent 4452632.
- 15) Naeem, M.; Masroor, M.; A. Khan and Moinuddin (2012). "Triaccontanol: a potent plant growth regulator in agriculture". *J. Plant Interactions* 7(2): 129-142. doi: 10.1080/17429145.2011.619281.
- 16) Vruddhi® - Plant Growth Promoter – Krushitek Pvt Ltd. (no date) (downloaded on 2017-5-19). <http://www.krushitek.com/vruddhi.html>.
- 17) Vitazyme in various crops in Latin America & the Caribbean (no date). Ag Biotech Inc. (Lakeville, NY, USA). [www.agbioinc.com](http://www.agbioinc.com).
- 18) IG Farbenindustrie AG (1928). British Patent 304150.
- 19) Warth, A. (1947). *The Chemistry and Technology of Waxes* (Reinhold Publ.): 298-320.
- 20) Gini Lacorte, C. (1945). *Química Industrial. Industrias Orgánicas* (El Ateneo, Buenos Aires): 170-204.
- 21) Marchés, J. (1982). "Clarificación de los jugos de caña por medio del proceso de sulfitación" en "Principios de Tecnología Azucarera" (Honig, P. ed. CECSA, 4a. Ed.). I: 503-560.
- 22) Panda, H. (2011). *The Complete Book on Sugarcane Processing and By-products of Molasses (with Analysis of Sugar, Syrup and Molasses)*. (Asia Pacific Buss. Press, New Delhi): 287-303.
- 23) Panda, H. (2011). op.cit. 399-407.
- 24) Balch, R.T. (1982). "Los lípidos de la caña de azúcar" en "Principios de Tecnología Azucarera" (Honig, P. ed., CECSA, 4a. Ed.). I: 189-203.

- 25) Bhosale, P.R.; Chonde Sonal, G.; Raut, P.D. (2012). "Studies on extraction of sugarcane wax from press mud of sugar factories from Kolhapur district, Maharashtra". *J. Environm. Res. Dev.* 6(3A): 715-720.  
[https://www.researchgate.net/profile/Prakash\\_Raut/publication/236676677\\_STUDIES\\_ON\\_EXTRACTION\\_OF\\_SUGARCANE\\_WAX\\_FROM\\_PRESS\\_MUD\\_OF\\_SUGAR\\_FACTORIES\\_FROM\\_KOLHAPUR\\_DISTRICT\\_MAHARASHTRA/links/00b49518dfbd8cf71c000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Prakash_Raut/publication/236676677_STUDIES_ON_EXTRACTION_OF_SUGARCANE_WAX_FROM_PRESS_MUD_OF_SUGAR_FACTORIES_FROM_KOLHAPUR_DISTRICT_MAHARASHTRA/links/00b49518dfbd8cf71c000000.pdf).
- 26) Attard, T.M.; McElroy, C.R.; Hunt, A.J. (2015). "Economic assesment of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of waxes as part of a maize stover refinery". *Int. J. Mol. Sci.* 16: 17546-17564.  
 doi: 10.3390/ijms160817546.  
<http://ai2-s2-pdfs.s3.amazonaws.com/dfbe/503b2046225eaca2be6e416abc2468a99ab8.pdf>.
- 27) Casas, L.; Hernández, Y.; Mantell, C.; Casdelo, N.; Martínez de la Ossa, E. (2015). "Filter cake oil-wax as raw material for the production of biodiesel: analysis of the extraction process and the transesterification reaction". *J. Chem.*, Vol 2015, article ID 946462, 9 pages.  
 doi: 10.1155/2015/946462.  
<https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/946462/>.
- 28) Sin, E.H.K. (2012). "The extraction and fractionation of waxes from biomass". PhD Thesis. Univ. York.  
[http://etheses.whiterose.ac.uk/3123/1/Emily\\_Sin\\_final\\_PhD\\_thesis.pdf](http://etheses.whiterose.ac.uk/3123/1/Emily_Sin_final_PhD_thesis.pdf).
- 29) Chatterjee, S.K.; Ghosh, P.K. (2009). "An improved me-

- thodfor the preparation of plant growth nutrient of enhanced activities”. Indian Patent 193527 (Application number 224/CAL/2002).
- 30) Chatterjee, S.K.; Ghosh, P.K. (1996). Indian Patent 188438 (Indian Patent Appl. 413/CAL/1996).
  - 31) Chinese Patent CN 101190873 B (2010). “Method for preparing triacontanol” (Appl. number CN 2006 10048852; CN 101190873 A).  
<https://patents.google.com/patent/CN101190873B/en>.
  - 32) Swami, S. (2012). “Natural waxes and triterpenic saponins as potential plant growth stimulants”. Thesis, Ms. Sci. in Agricultural Chemicals. Indian Agricultural Res. Inst. (New Delhi).  
[file:///D:/Descargas/Saurabh\\_MSc\\_Thesis%20\(20004\).pdf](file:///D:/Descargas/Saurabh_MSc_Thesis%20(20004).pdf).
  - 33) Vogel’s Textbook of Practical Organic Chemistry (1989). (Furniss, B.S.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R. Revs. Longman Sci. and Techn. V Ed.): 216-217.  
<https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/Vespiary/talk/files/678-VogelPracticalOrganicChemistry5Thb074.pdf?topic=435.0>.
  - 34) Love, B.; Goodman, M.M. (1967). Chem. Ind. (London): 2026.
  - 35) Jaybhay, S.; Chate, P.; Ade, A. (2010). “Isolation and identification of crude triacontanol from rice bran wax”. J. Exp. Sci. 1(2): 26.
  - 36) Ishaka, A.; Imam, M.V.; Mahamud, R.; Zuki, A.B.Z.; Maznah, I. (2014). “Characterization of rice bran policosanol and its nanoemulsion formulation”. Int. J. Nanomed. 9: 2261-2269.

- doi: 10.2147/IJN.S56999.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026553/>.
- 37) Godrej, N.B.; Thakur, M.S. (1986). "Plant growth promoter from rice bran and process for making and using". U.S. Patent 4605430.
  - 38) Strobach, O.; Wickmann, P.A. (1932). "Method for the extraction of tea aroma". U.S. Patent 1868999.
  - 39) Augustine, B.; Roy, G.K. (1981). "Recovery of chemicals from agricultural residues – a critical review". *J. Institution of Eng. (India)* 62, pt ND 1: 36-41.  
<http://dspace.nitrkl.ac.in/dspace/bitstream/2080/935/1/gkroy38.pdf>.
  - 40) Seshadri, R.; Nagalakshmi, S.; Madhusudhana Rao, J.; Natarajan, C.P. (1986). "Utilization of by-products of the tea plant: a review [1986]". *Tropical Agricult.* 63(1): 2-6.  
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TT8700334>
  - 41) Rao, J.M.; Natarajan, C.P.; Seshadri, R. (1987). "A study of the occurrence of n-triacontanol, a plant growth regulator, in tea". *J. Sci. Food Agricult.* 39(2): 95-99.  
doi: 10.1002/jsfa.2740390202.
  - 42) Chowdhury, A.; Sarkar, S.; Chowdhury, A.; Bardhan, S.; Mandal, P.; Chowdhury, M. (2016). "Tea waste management: a case study from West Bengal, India". *Indian J. Sci. Technol.* 9(42), 6 pages.  
doi: 10.17485/ijst/2016/v9i42/89790.  
[https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50408839/Tea\\_waste\\_Ma-](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50408839/Tea_waste_Ma-)

- nagement.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYY-  
GZ2Y53UL3A&Expires=1513191067&Signa-  
ture=yYGaOCeVfeFrdrMETsuNBICDp4g%-  
3D&response-content-disposition=inline%3B%20  
filename%3DTea\_waste\_Management.pdf.pdf.
- 43) Chambers, J.W. (2014). "Tea extracts and uses in promo-  
ting plant growth". U.S. Patent Appl. US2014/0113814  
A1.
  - 44) Franca, A.S.; Oliveira, L.S. (2009). "Coffee processing  
solid wastes: Current uses and future perspectives" in  
Agricultural Wastes (Ashwort, G.S.; Acevedo, P. eds.  
Nova Sci. Publishers, Inc.): 155-189.  
[https://www.researchgate.net/profile/Adriana\\_Franca/publication/285932725\\_Coffee\\_processing\\_solid\\_wastes\\_Current\\_uses\\_and\\_future\\_perspectives/links/569778cf08ae1c427904d2e3.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Adriana_Franca/publication/285932725_Coffee_processing_solid_wastes_Current_uses_and_future_perspectives/links/569778cf08ae1c427904d2e3.pdf).
  - 45) Figueroa, G.A.; Homann, T.; Rawel, H.M. (2016).  
"Coffee production wastes: Potential and perspectives".  
Austin Food Sci 1(3): 1014 (5 pages).  
<http://austinpublishinggroup.com/food-sciences/full-text/afs-v1-id1014.php>.
  - 46) Rathinavelu, R.; Graziosi, G. (2005). "Potential alterna-  
tive uses of coffee wastes and by-products". Int. Coffee  
Org., ED 1967/05 E.  
<http://www.ico.org/documents/ed1967e.pdf>.
  - 47) Neill, J. (2014). "6 ways the coffee industry is turning  
waste into a resource".  
<http://www.sustainableamerica.org/blog/6-ways-the-coffee-industry-is-turning-waste-into-a-resource/>.  
(downloaded 2017-5-31).

- 48) Echeverría, M.C.; Nuti, M. (2017). "Valorisation of the residues of coffee agro-industry: perspectives and limitations". *The Open Waste Management Journal* 10: 13-22. doi: 10.2174/1876400201710010013.  
<https://benthamopen.com/contents/pdf/TOWMJ/TOWMJ-10-13.pdf>.
- 49) Moore, V. (no date). "What's your coffee costing the planet? - Environmental impact of the coffee trade". [www.sustainablebusiness toolkit.com/environmental-impact-coffee-trade](http://www.sustainablebusiness toolkit.com/environmental-impact-coffee-trade) (downloaded 2017-6-1).
- 50) USAID-ACCESO. Snapshot (2013). "Organic fertilizers improve coffee production, environment". (U.S. Agency Internat. Development).  
[http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PA00KNKT.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PA00KNKT.pdf)
- 51) Redhawk, B. (2015). "Most everything you wanted to know about spent coffee grounds".  
<https://permaculturenews.org/forums/index.php?-threads/most-everything-you-wanted-to-know-about-spent-coffee-grounds.1399/>. (downloaded 2017-6-1)
- 52) Chalker-Scott, L. (2016). "Using coffee grounds in gardens and landscapes". Washington State University Extension (WSU Peer Reviewed FS207E).  
<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/FS207E/FS207E.pdf>.
- 53) Jamaludin, A.A.; Mahmood, N.Z. (2008). "The potential of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting". *Proc. Int. Conf. Environ. Res. Technol.. Penang (Malaysia)*. 28-30 May 2008 (Univ. Sains Malaysia Edit): 76-80.  
<http://agris.upm.edu.my:8080/dspace/handle/0/8610>.

- 54) Marro de café (enmienda orgánica húmica) (2016). Bures Profesional S.A.; Rev. 02.  
[www.burespro.com](http://www.burespro.com).
- 55) Campos Vega, R.; Loarca-Piña, G.; Vergara-Castañeda, H.; OOmah, B.D. (2015). "Spent coffee grounds: a review on current research and future prospects". Trends in Food Sci. Technol. Volume 45, Issue 1, September 2015, Pages 24-36  
doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.012.
- 56) Yamane, K.; Kono, M.; Fukunaga, T.; Iwai, K. and others (2014). "Field Evaluation of coffee grounds application for crop growth enhancement, weed control and soil improvement". Plant Production Science 17(1): 93-102.  
doi: 10.1626/pps.17.93.  
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1626/pps.17.93>.
- 57) Dzung, N.A.; Dzung, T.T.; Khanh, V.T.P. (2013). "Evaluation of coffee husk compost for improving soil fertility and sustainable coffee production in rural central highland of Vietnam". Resources and Environment 3(4): 77-82.  
doi: 10.5923/j.re.20130304.03.  
<http://article.sapub.org/10.5923.j.re.20130304.03.html>.
- 58) Kanyiri, G.; Waswa, F. (2017). "Enhancing benefits from biomass wastes within small-medium scale coffee processing factories in Kiambu County, Kenya". African J. Environm. Sci. Technol. 11(4): 198-206.  
doi: 10.5897/AJEST2016.2243.  
<http://www.academicjournals.org/journal/AJEST/article-full-text-pdf/1FB6E1563351>



- 59) Kansongo, R.K.; Verdoot, A.; Kanyankagote, P.; Baert, G.; Van Ranst, E. (2011). "Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments". *Soil Use and Management* 27: 94-102.  
doi: 10.1111/j.1475-2743.2010.00315.x.
- 60) Barbero, S.; Toso, D. (2010). "Systemic design of a productive chain: reusing coffee waste as an input to agricultural production". *Environ. Qual. Manag.* 19(3): 67-77.  
doi: 10.1002/tqem.20254.  
<http://porto.polito.it/2317495/2/2317495.pdf>.
- 61) Gomes, T.; Pereira, J.A.; Ramalhosa, E.; Casal, S.; Baptista, P. (2013). "Effect of fresh and composted spent coffee grounds on lettuce growth, photosynthetic pigments and mineral composition". VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Agrícolas. Ref. No. P0424.  
<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/8791/1/23%20Artigo%20Crescimento%20das%20Plantas%20Cong%20Madrid.pdf>.
- 62) Padmapriya, R.; Tharian, J.A.; Thirumalasundari, T. (2013). "Coffee waste management – An overview". *Int. J. Curr. Sci.* 9: E83-91.  
<http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/Coffee%20waste12.pdf>.
- 63) Goldmann, G. (1972). "Soil conditioner and garden mold on the basis of coffee extraction residues". U.S. Patent 3640696.
- 64) Ferguson, F.E.; Hughes, R.R.; Fersch, K.E. (1981). "Urea-formaldehyde granular fertilizer". U.S. Patent 4280830.

- 65) Lodwig, J.W.; Krueger, K.P. (2015). "Organic soil treatment compound and method of making and using". U.S. Patent 9073799.
- 66) Chinese Patent Application CN 1156134 A (1997). "Method for producing special organic fertilizer with soil improvement function".
- 67) Chinese Patent CN 102515892 B (2012). "Biomass organic fertilizer and its processing method".
- 68) Iijima, R. (2002). "Method for disposing waste". U.S. Patent 6365384 B1.
- 69) Olbrich, H. (1963). "The molasses" (Biotechnologie-Kempe GmbH, 2006.  
[http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses\\_OLBRICH.pdf](http://www.biotechnologie-kempe.de/Molasses_OLBRICH.pdf).
- 70) Sarka, E.; Bubnik, Z.; Hinkova, A.; Gebler, J.; Kadlec, P. (2013). "Beet molasses-desugarization, composition, properties and application possibilities" Sugar Industry 138: 105-114. <http://w2.zuckertechniker.de/uploads/media/2013-105-114.pdf>.
- 71) Sarka, E.; Bubnik, Z.; Hinkova, A.; Gebler, J.; Kadlec, P. (2012). "Molasses as a by-product of sugar crystallization and a perspective raw material". Procedia Eng. 42: 1219-1228.  
doi: 10.1016/j.proeng.2012.07.514.  
[https://ac.els-cdn.com/S1877705812029219/1-s2.0-S1877705812029219-main.pdf?\\_tid=-d955e104-e292-11e7-8828-00000aab0f02&acdnat=1513450779\\_248c317945299fb3fc52b8f07079f7d7](https://ac.els-cdn.com/S1877705812029219/1-s2.0-S1877705812029219-main.pdf?_tid=-d955e104-e292-11e7-8828-00000aab0f02&acdnat=1513450779_248c317945299fb3fc52b8f07079f7d7).
- 72) Agriculture Solutions Inc. (2012). "What is black strap molasses?"

- www.agriculturesolutions.ca/molasses.
- 73) Smith, H. (2015). "Feeding your garden cane molasses".  
<https://www.maximumyield.com/feeding-your-garden-cane-molasses/2/1205>.
- 74) Dotaniya, M.L.; Datta, S.C.; Biswas, D.R.; Dotaniya, C.K. and others (2016). "Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health". *Int. J. Recycl. Org. Waste Agricult.* 5: 185-194.  
 doi: 10.1007/s40093-016-0132-8.  
[https://www.researchgate.net/profile/Dr\\_Dipak\\_Biswas/publication/304612351\\_Use\\_of\\_sugarcane\\_industrial\\_by-products\\_for\\_improving\\_sugarcane\\_productivity\\_and\\_soil\\_health/links/577b4d5a08ae355e74f07a22.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Dr_Dipak_Biswas/publication/304612351_Use_of_sugarcane_industrial_by-products_for_improving_sugarcane_productivity_and_soil_health/links/577b4d5a08ae355e74f07a22.pdf).
- 75) Office of Industrial Technologies (U.S. Dept. of Energy) (1999). "Bioconversion of sugar cane molasses". DOE/GO-10099-889. Order NICE<sup>3</sup> AG-1-  
<https://www.oit.doe.gov>
- 76) LetCo. Liquid Energy Trading Company Swiss S.A. (no date). "Condensed molasses soluble/vinasses". Product code LQS INT2alle (3 pages).  
<http://www.liquid-energy.ch/wp/wp-content/uploads/A-2-CMS-Vinasses-General-information-EN-LQS-INT2alle-1.pdf>.
- 77) BioBizz Worldwide, BB Products (no date). "Vinasse (Cane-beet-). Petition to the USDA Nat.Org. Program and Nat. Org. Standards Board.  
<https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Vinasse.pdf>.

- 78) Rodrigues Reis, C.E., Hu, B. (2017). “Vinasse from sugarcane ethanol production: better treatment or better utilization?” *Frontiers in Energy Research* 5(7): 7 pages. doi: 10.3389/fenrg.2017.00007.  
[https://www.researchgate.net/profile/Cristiano\\_Reis3/publication/315890007\\_Vinasse\\_from\\_Sugarcane\\_Ethanol\\_Production\\_Better\\_Treatment\\_or\\_Better\\_Utilization/links/58f246a6aca27289c2167e04/Vinasse-from-Sugarcane-Ethanol-Production-Better-Treatment-or-Better-Utilization.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Cristiano_Reis3/publication/315890007_Vinasse_from_Sugarcane_Ethanol_Production_Better_Treatment_or_Better_Utilization/links/58f246a6aca27289c2167e04/Vinasse-from-Sugarcane-Ethanol-Production-Better-Treatment-or-Better-Utilization.pdf).
- 79) Jiranuntipon, S. (2009). “Décoloration d’effluents de distillerie par un consortium microbien”. Thèse du Doctorat de l’Université de Toulouse: 8-14.  
<http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000770/01/Jiranuntipon.pdf>.
- 80) Moran-Salazar, R.G.; Sánchez-Lizarraga, A.L.; Rodriguez-Campos, J.; Dávila-Vázquez, G. and others (2016). “Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives”. *Springer Plus* 5: 1007. doi: 10.1186/s40064-016-2410-3.  
<https://pdfs.semanticscholar.org/5720/3858c7b-6f3652239692f9db8135b1a2a0fbe.pdf>.
- 81) Vadivel, R.; Minhas, P.S.; Kumar, P.S.; Singh, Y. and others (2014). “Significance of vinasses waste management in agricultural and environmental quality – Review” *African J. Agricultura Res.* 9 (38): 2862-2873. doi: 10.5897/AJAR2014.8819. Article No. 94224DC47396.  
[https://www.researchgate.net/profile/Rajagopal\\_Vadivel/publication/281426819\\_Significan-](https://www.researchgate.net/profile/Rajagopal_Vadivel/publication/281426819_Significan-)

- ce\_of\_vinasses\_waste\_management\_in\_agriculture\_and\_environmental\_quality-Review/links/55e67fbc08aede0b57376e29/Significance-of-vinasses-waste-management-in-agriculture-and-environmental-quality-Review.pdf.
- 82) Chhaya, V.; Kumar, R. (2014). "Utilization of distillery waste water in fertigation: a beneficial use". *Int. J. Res. Chem. and Environ.* 4(4): 1-9.  
[www.ijrce.org/uploads/20/843\\_pdf.pdf](http://www.ijrce.org/uploads/20/843_pdf.pdf).
- 83) España-Gamboa, E.; Mijangos-Cortes, J.; Barahona-Pérez, L.; Domínguez-Maldonado, J. and others (2011). "Vinasses: characterization and treatments". *Waste Management and Res.* 29(12): 1235-1250.  
 doi: 10.1177/0734242X10387313.  
<https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/268/1/15973.pdf>.
- 84) Barbosa Cortez, L.A.; Rossel, C.E.V.; Jordan, R.A.; Leal, M.R.L.V.; Lora, E.E.S. (2014). "R&D needs in the industrial production of vinasse" in "Sugarcane Bioethanol – RD for productivity and sustainability" (Cortez, L.A.B. ed., Edgar Blücher Edt, Sao Paulo): 619-636.  
 doi: 10.5151/BlucherOA-Sugarcane-SUGARCANE-BIOETHANOL\_55.  
[http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/openaccess/sugarcane-bioethanol/SUGARCANE-BIOETHANOL\\_55.pdf](http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/openaccess/sugarcane-bioethanol/SUGARCANE-BIOETHANOL_55.pdf).
- 85) Castro, G.A. (2009). "El tratamiento de las vinazas – La recirculación". *Revista Publicaciones e Investigación* 3(1): 51.  
<http://oaji.net/articles/2017/5082-1501173792.pdf>.

- 86) Ramos-Hernández, R.; Mota-López, D.R.; Sánchez-Ramírez, Ch.; Alor-Hernández, G. and others (2016). "Assessing the impact of a vinasse pilot-plant scale-up on the key processes of the ethanol supply chain". *Math. Problems in Eng.* 2016, Article ID 3504682, 9 pages.  
doi: 10.1155/2016/3564682.  
<https://www.hindawi.com/journals/mpe/2016/3504682/>.
- 87) Román, D.; Pérez, N.; Casanova, J.; Muzali, M. (2007). "Design of a producing plant of bio-fertilizer from vinasse of sugarcane". 5th Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technol. (LACCEI 2007): 6 C, 4-1.  
[www.laccei.org/LACCEI2007-Mexico/Papers%20PDF/ET155\\_Roman.pdf](http://www.laccei.org/LACCEI2007-Mexico/Papers%20PDF/ET155_Roman.pdf).
- 88) Irisarri, D. (2006). "Usos industriales y agrícolas de la vinaza de caña de azúcar". *Tecnicaña* 10(17): 19-24.  
[http://tecnicana.org/pdf/2006/tec\\_v10\\_no17\\_2006\\_p19-24.pdf](http://tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p19-24.pdf).
- 89) Irisarri, D. (2005). "Novel product for agricultural use, which is obtained from distillery spent wash". Patent Appl. WO 2005009923 A1.
- 90) Mantelatto, P.E.; Boscariol, F.C.; Gurjel, M.N.A.; César, A.R.P.; Ciambelli, J.R.P. (2009). "Process for producing an organo-mineral fertilizer". Patent Appl. WO 2009129589 A2.
- 91) Bittencourt Sydney, E. (2013). "Valorization of vinasse as broth for biological hydrogen and volatile fatty acids production by means of anaerobic bacteria". PhD The-

- sis in Process Engin., Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II (English).  
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00914329/document>.
- 92) Korndörfer, G.H.; Nolla, A.; Gama, A.J.M. (2010). "Manejo, aplicación y valor fertilizante de la vinaza para caña de azúcar y otros cultivos". *Tecnicaña* 24: 23-28.  
[www.tecnicana.org/pdf/2010/tec\\_no24\\_2010\\_p25-30.pdf](http://www.tecnicana.org/pdf/2010/tec_no24_2010_p25-30.pdf).
  - 93) Dametie, A.; Fantaye, A.; Teshome, Z. (2014). "Estimating effect of vinasse on sugarcane through application of potassium chloride at Metahara sugarcane plantation". *Adv. Crop Sci. Technol.* 2(5): 1000154.  
 doi: 10.4172/2329-8863.1000154.  
<https://www.omicsonline.org/open-access/estimating-effect-of-vinasse-on-sugarcane-through-application-of-potassium-chloride-at-metahara-sugarcane-plantation-2329-8863.1000150.pdf>.
  - 94) Obono, F.; Nsangou, A.N.; Ngaha, D.; Tchawou; Kapseu, C. (2016). "Valuation of vinasse as organic fertilizer on the corn field". *Am. Sci. Res. J. Eng. Technol. and Sciences (ASRJETS)* 23(1): 185-189.  
<file:///D:/Descargas/1754-5561-1-PB.pdf>
  - 95) García, A.; Rojas, C.A. (2006). "Posibilidades de uso de la vinaza en agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos". *Tecnicaña* 10(17): 3-13.  
[http://tecnicana.org/pdf/2006/tec\\_v10\\_no17\\_2006\\_p3-13.pdf](http://tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf).
  - 96) Larsson, E.; Tengberg, T. (2014). "Evaporation of vinasse; pilot plant investigation and preliminary process design". Master's Thesis for Chem. Eng. Chalmers Univ. (Goteborg, SW).

- <http://publications.lib.chalmers.se/records/full-text/195305/195305.pdf>.
- 97) Lima, A.V.A.; Barbosa, M.A.A.; Cunha, L.C.S.; de Morais, S.A.L.; de Aquino, F.J.T. and others (2017). “Volatile compounds obtained by the hydrodistillation of sugarcane vinasse, a residue from ethanol production”. *Rev. Virtual Quim.* 9(2): 764-773.  
doi: 10.21577/1984-6835.20170047.  
<http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v9n2a22.pdf>.
- 98) Dowd, M.K.; Johanssen, S.L.; Cantarella, L.; Reilly, P.J. (1994). “Low molecular weight organic composition of ethanol spillage from sugarcane molasses, citrus waste and sweet whey”. *J. Agric. Food Chem.* 42(2): 283-288.  
doi: 10.1021/jf00038a011.  
[http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=cbe\\_pubs](http://lib.dr.iastate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1012&context=cbe_pubs).
- 99) Carrilho, E.N.M.V.; Labuto, G.; Kamogawa, M.Y. (2016). “Destination of vinasse, a residue from alcohol industry: resource recovery and pollution” in “Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution” (Prasad, M.N.V.; Shih, K. eds.; Acad. Press. ISBN 978-0-12-803837.6): 21-44.  
doi: 10.1016/B978-0-12-803837-6.00002-0.
- 100) Ferreira, L.F.R.; Queijeiro López, A.M.; Monteiro, R.T.R.; Ruzene, D.S.; Silva, D.P. (2014). “Biodegradation of vinasse: Fungal lignolytic enzymes and their application in bioethanol industry” in “Fungal Enzymes” (Polizeli, M. de L.T.M.; Rai, M. eds. CRC Press, Taylor and Francis Group. ISBN 978-1-4665-9455-5): 65-93.



- 101) Rajasundari, K.; Murugesan, R. (2011). “Decolourization of distillery waste water – Roles of microbes and their potential oxidative enzymes (Review)”. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.* 1(4): 54-68.  
[https://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%201\(4\)%2054-%2068,%202011.pdf](https://www.textroad.com/pdf/JAEBS/J.%20Appl.%20Environ.%20Biol.%20Sci.,%201(4)%2054-%2068,%202011.pdf).
- 102) Benke, M.B.; Mermut, A.R.; Chatson, B. (1998). “Carbon-13 CP/MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane and distillery waste”. *Can. J. Soil Sci.* 78: 227-236.  
[www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/S97-036](http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/S97-036).
- 103) de Souza, R.P.; Girardi, F.; Santana, V.S.; Fernandes-Machado, N.R.C.; Gimenes, M.L. (2013). “Vinnasse treatment using a vegetable tannin coagulant and photocatalysis”. *Acta Scientiarum Technol. Maringá* 35(1): 89-95.  
[https://www.researchgate.net/profile/Renata\\_Souza17/publication/269566906\\_Vinasse\\_treatment\\_using\\_a\\_vegetable-tannin\\_coagulant\\_and\\_photocatalysis/links/560aaf5008ae840a08d65aab.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Renata_Souza17/publication/269566906_Vinasse_treatment_using_a_vegetable-tannin_coagulant_and_photocatalysis/links/560aaf5008ae840a08d65aab.pdf).
- 104) Magalhães, N.C.; Silva, A.L.D.; Amaral, M.C.S.; Lange, L.C.; Neta, L.F. (2012). “Treatment of vinasse employing ultrafiltration combined with anaerobic bioreactor with membrane and post-treatment with nanofiltration allowing it to reuse”. *Procedia Eng.* 44: 1923-1924. (Euromembrane Conference 2012 [P3.111].  
doi: 10.1016/j.proeng.2012.08.1006.

- [https://www.researchgate.net/publication/273531918\\_Treatment\\_of\\_Vinasse\\_Employing\\_Ultrafiltration\\_Combined\\_with\\_Aerobic\\_Bioreactor\\_with\\_Membrane\\_and\\_Post-treatment\\_with\\_Nanofiltration\\_Allowing\\_it\\_to\\_Reuse](https://www.researchgate.net/publication/273531918_Treatment_of_Vinasse_Employing_Ultrafiltration_Combined_with_Aerobic_Bioreactor_with_Membrane_and_Post-treatment_with_Nanofiltration_Allowing_it_to_Reuse).
- 105) Garud, R.M.; Kore, S.V.; Kore, V.S.; Kulkarni, G.S. (2011). "A short review on process and applications of reverse osmosis". *Universal J. Environ. Res. Technol.* 1(3): 233-238.  
<http://environmentaljournal.org/1-3/ujert-1-3-2.pdf>.
  - 106) Couvallier, E.; Salgado Ruiz, B.; Lameloise, M-L.; Decloux, M. (2006). "Usefulness of reverse osmosis in the treatment of condensates arising from the concentration of distillery vinasses". *Desalination* 196: 306-317.  
doi: 10.1016/j.desal.2006.02.002.
  - 107) de Moraes Santos Gomes, M.T.; Eça, K.S.; Viotto, L.A. (2011). "Concentração de vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas". *Pesq. Agropec. Bras., Brasília* 46(6): 633-638 (portugués).  
[www.scielo.br/pdf/pab/v46n6/a09v46n6.pdf](http://www.scielo.br/pdf/pab/v46n6/a09v46n6.pdf).
  - 108) Murthy, Z.P.V.; Chaudhary, L.B. (2009). "Treatment of distillery spent wash by combined UF and RO processes". *Global NEST Journal* 11(2): 235-240.  
[https://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/235-240\\_11\\_2\\_581\\_Murthy.pdf](https://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/235-240_11_2_581_Murthy.pdf).
  - 109) New Logic Research Inc. (no author, no date). USEP Filtration in Ethanol Production. Application Note.  
[www.usep.com/pdf/VSEP-Membrane-Separation-Ethanol-Application-Note.pdf](http://www.usep.com/pdf/VSEP-Membrane-Separation-Ethanol-Application-Note.pdf).

- 110) Breda, K.; Lorain, O.; Espenan, J-M.; Pontalier, P-Y (2011). "Nanofiltration for vinasses treatment". Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (Ecole Sup. des Ingenieurs en Arts Chimiques et Technologiques, ENSIACET).  
[http://inpact.inp-toulouse.fr/archives/WasteEng05/FullText\\_G/230\\_PierreYves.Pontalier\\_05\\_02\\_11.pdf](http://inpact.inp-toulouse.fr/archives/WasteEng05/FullText_G/230_PierreYves.Pontalier_05_02_11.pdf)
- 111) Osmonics Duratherm®. Product brochure.
- 112) Díaz, V.B. (2016). Conversión Técnica de Proteínas. Valorización de desechos proteicos. (AMV Ediciones, Madrid, ISBN 978-84-945558-3-1): 16-44.
- 113) "Ion exchange resins, adsorbent resins, chromatographic resins in food industry" (no date).  
[http://www.biokal.com/assets/uploads/Ion-exchange\\_and\\_adsorbent\\_resins\\_for\\_food\\_industry.pdf](http://www.biokal.com/assets/uploads/Ion-exchange_and_adsorbent_resins_for_food_industry.pdf)
- 114) [www.dowwaterandprocess.com/en/Products/Adsorbent\\_Resins](http://www.dowwaterandprocess.com/en/Products/Adsorbent_Resins).
- 115) Rohm and Haas Co. (1979). Summary Bulletin Amberlite™. Polymeric Adsorbents. Technical Bulletin IE 172-75/79. Fluid Process Chemicals.
- 116) Aerts, P.E.M.; Ramos, R.; Pease, S.; Baudouin, S. (2016). "Extraction of valuable components from cane vinasse". U.S. Patent Appl. 20160325232 A1.



**CAPÍTULO 7**

**APLICACIÓN DE  
OLIGOSACARINAS A LOS  
CULTIVOS TROPICALES**



## 7.1 Introducción

En el presente capítulo se efectuará una breve revisión bibliográfica sobre el empleo de las oligosacarinas en el cultivo comercial de especies tropicales.

Existen cultivos característicos de las zonas tropicales y subtropicales, que históricamente han sido considerados como fuente de supervivencia de poblaciones rurales empobrecidas, no siempre orientadas por profesionales autorizados y/o incapaces de aprovechar los modernos conceptos agronómicos de la agricultura científica. El autor piensa que el detalle de usos y extensión de las aplicaciones de estos promotores de crecimiento vegetal puede ayudar a mejorar las condiciones de vida del trabajador rural en los trópicos, aumentar los rendimientos del cultivo, minimizar el uso abusivo de fertilizantes químicos (con lo cual no solo se logran mejoras en la esfera económica, sino que también disminuye el impacto ambiental que el exceso de fertilizantes químicos genera, tal como polución de los suelos, contaminación de napas y cursos hídricos, etc.) e introducir conocimientos sustanciales al alcance del productor rural. En este sentido,

se han elegido cinco cultivos tropicales, sean éstos el cultivo del café, cacao, caña de azúcar, ananá y banana.

## 7.2 Café

Este cultivo es una de las mayores “commodities” en el mercado mundial y se lo cultiva en el África subsahariana, el lejano Oriente (India a Indonesia) y Latinoamérica (1). Como se vino observando, en este cultivo el costo de fertilizantes químicos y el laboreo se cuentan entre las más altas inversiones (1), por lo que, en orden a minimizar dicho costo, es necesario hacer un correcto uso de la fertilización química.

De hecho, el desarrollo y la producción del cultivo dependen en gran forma del manejo tecnológico del cafetal, las condiciones climáticas y del suelo de la finca, habiéndose verificado que un aumento del empleo de fertilizantes no siempre significa un incremento en la producción de café (aunque es cierto que la administración sub-óptima de fertilizantes conduce a un decremento en la producción del cafetal) (2).

El esquema de fertilización del cafeto se encuentra abundantemente detallado en la bibliografía autorizada (2) (3); se encuentra bien documentado que el programa de fertilización debe ser seleccionado en base al análisis de los suelos de la finca, o por lo menos en función de la fertilidad de los suelos de la región (3). Para el caso de Costa Rica, las fórmulas de fertilizantes deberían contener un mínimo de 15% N, 3%  $P_2O_5$  y 4%  $MgO$ , con 0,33% B (3).



La Asociación Nacional del Café (Guatemala) (ANACAFÉ) ha publicado un excelente esquema de fertilización de cafetales, con detalle de los elementos químicos que extrae del suelo el vegetal y la forma de reincorporarlos al sistema (4). Lo mismo puede verificarse en lo publicado por el Centro de Investigación del Café y en los catálogos de las compañías industriales comercializadoras de fertilizantes (5) (6). Sin embargo, la revisión de esta bibliografía especializada en el cultivo de los cafetales señala la ausencia de indicaciones respecto del uso de oligosacarinas para la biopromoción de estos cultivos. Es verdad que existen excelentes productos comerciales a base de oligosacarinas, no solo para el café, sino también para una gran cantidad de cultivos (7), con el objeto de inducir resistencia natural a patógenos. Pero la utilización de estas preparaciones, científicamente desarrolladas, no parece estar ampliamente difundida.

En efecto, el empleo de oligosacarinas en el cultivo del café solo parece estar referenciado en la bibliografía de investigación, la cual tampoco es extensa (por lo menos, en lo que le consta al presente autor).

Van y colaboradores (8) han comprobado los efectos benéficos que proporciona a la planta de café la aspersión foliar de quitoooligosacarinas.

Las oligosacarinas derivadas de pectina de citrus aplicadas a cultivos de café (también de caña de azúcar y bananeros) han permitido minimizar el empleo de otras fitohormonas, estimulando el crecimiento del vegetal y de las raíces, así como la reducción del tiempo requerido para la propagación (9).

No obstante lo expuesto, el uso científico de oligosacari-

nas en la bioestimulación de cultivos de cafeto, documentación de ensayos a campo, evaluación de rendimientos, utilidad de su aplicación a cultivos desarrollados sobre suelos de diferente naturaleza, etc., todavía parece pendiente de rigurosa experimentación.

## 7.3 Cacao

El cacao es un característico cultivo de naturaleza tropical que requiere niveles de precipitación abundantes (1600-2500 mm anuales), temperaturas oscilantes entre los 23 y 32°C, una altitud de cultivo comprendida entre los 800 m y el nivel del mar y sombra proveniente de otras plantas (las cuales deben ser sembradas al efecto) (10). Los fertilizantes empleados en su cultivo incluyen los de tipo NPK, abonos orgánicos tales como el compost y el “bocashi” (descomposición aeróbica de residuos biológicos, excremento de ganado, gallinaza, cáscaras de arroz y/o café, melaza, cal y cenizas) (11).

El suelo en el que se desarrolla el cacaotal no debe ser excesivamente arenoso, por el contrario, debe poseer adecuada cantidad de materia orgánica o humus.

Este terreno, base del cultivo del cacaotal, resulta empobrecido debido a la fuerte demanda de nutrientes que efectúa la plantación, lo que resulta parcialmente subsanado por la aplicación de fertilizantes químicos y también de los abonos orgánicos ya citados. En este sentido, el empleo de la fertilización con compuestos nitrogenados (urea, excremento animal) se encuentra bien referenciada (12) (13) (14).

El empleo de oligosacarinas (en particular, oligogalacturónidos) sobre los botones florales de cacao permitió demostrar la formación de callo y de raíces (Saborio (15) citando a Díaz et al (16)).

En una interesante contrastación sobre la bioactividad de diferentes bioestimulantes en la propagación de plantas injertas de cacao, Rodríguez y Remberto (17) han demostrado la superación significativa de los parámetros evaluados respecto del testigo (altura y diámetro del injerto, número de hojas y tasa de mortalidad), habiendo incluido en el estudio una composición comercial en base a oligosacarinas (alginate oligosacarinas extraídas de algas) (Rootmost®; Canada Oceanic).

El producto Fitomas-E®, desarrollado por el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ha sido ensayado con pleno éxito en la mejora y bioestimulación de cultivos tropicales, tales como la guayaba y el cafeto (18) (19). Sin embargo, se trata de una composición que contiene multiplicidad de derivados de desechos de la industria azucarera, tales como aminoácidos libres, lípidos, sacáridos, N, P y K (18) (20), de manera que su relevante acción bioestimulante no puede asignarse exclusivamente a la presencia de oligosacáridos.

El regulador de crecimiento vegetal triacantanol, también derivado de la industrialización de la caña de azúcar (véase 6.2.1) ha demostrado su utilidad en la germinación de los plantones de cacao procedentes de semilleros (21).

## 7.4 Caña de azúcar

Acorde con Pérez Zamora (22), “ la caña de azúcar es un cultivo semi-perenne, que se siembra una vez y se cosecha entre 4 y 6 veces en dependencia del manejo agronómico”.

Pertenece al género *Saccharum*, del cual existen variedades en especies. Se la cultiva en Indonesia, Sudáfrica, Australia, Brasil, Colombia, Perú, Argentina, Nigeria, etc., dado que es un cultivo característicamente tropical, aunque se adapta bien a variaciones climáticas ya distintos suelos. Se la cultiva entre los 35° N y 35° S y, sobre todo, en altitudes por debajo de los 1000 metros snm (23). Sus raíces pueden extenderse hasta unos cuatro metros por debajo de la superficie del terreno y es una planta voraz consumidora de nutrientes; de hecho, presenta una amplia respuesta frente a la adición de fertilizantes nitrogenados (fundamentalmente urea) (22) (23). Además de la suministración de fertilizantes NPK, la fertilidad de la caña de azúcar mejora por la adición al suelo de vinazas, compost de bagazo, tortas de filtro prensa (“mud”, “press mud”, “lodos de prensa”) y desechos vegetales, los cuales se vierten solos o mezclados entre sí (23).

La aplicación de fertilizantes nitrogenados, fosfatados y potásicos en las primeras etapas de crecimiento vegetal incrementa los rendimientos de sacarosa obtenida (24), y como complemento fertilizante, la administración de vinazas efectuada profesionalmente ha proporcionado excelentes resultados: de hecho, estos criterios agronómicos han evitado inaugurar nuevas áreas de cultivo en Brasil (primer productor mundial) (25).

Al respecto, la bibliografía citada (22) (23) (24) (25) es

verdaderamente relevante. Sin embargo, no se observa en ellas ninguna aplicación de productos a base de oligosacarinas sobre estos cultivos. Esto hace creer que esta práctica no es extendida.

El uso práctico de oligosacarinas (oligogalacturónidos) en el cultivo “en vitro” de caña de azúcar ha sido cuidadosamente revisado por Cabrera et al (9) y por Falcón Rodríguez y colaboradores (26).

Hien (27) lleva a cabo un importante estudio a campo sobre cultivos de caña de azúcar (también de arroz) aplicando quitoooligosacarinas de distinto grado de acetilación y obtenidas de distinta forma (degradación peroxidolítica, degradación radiolítica, deacetilación llevada a cabo con distintas concentraciones de NaOH a distintos tiempos de reacción). Hien comprueba que, en todos los casos, la tasa de enfermedad en las hojas se reduce significativamente en función de la concentración de quitoooligosacarina aplicada; de la misma manera, la productividad (ton/ha) se incrementa hasta en un 16% respecto del cultivo “control”.

Izquierdo y su notable equipo de investigadores cubanos (28) efectuaron recientemente una significativa contribución sobre el comportamiento de las pectinooligosacarinas (obtenidas de pectina de citrus, Pectimorf®) sobre variedad de especies vegetales, entre ellas, caña de azúcar (cultivo “in vitro”); la administración del promotor de crecimiento en el medio de cultivo (a distintas concentraciones) estimula fuertemente la producción de embriones, con marcada reducción en la dispersión de este proceso.

Estas aplicaciones tan provechosas sobre los cultivos vegetales han originado la reciente aparición de patentes que

cubren productos y usos de las oligosacarinas, no solo como bioestimulantes de los cultivos, sino también como enaltecedor de las defensas del vegetal.

Se ha establecido recientemente (29) la protección contra especies fitopatógenas de hongos que la aspersión foliar de paredes celulares de levadura generan sobre gran cantidad de especies vegetales, entre ellas, la caña de azúcar (véase 3.1.1 – Residuos de levaduras como materia prima).

Una interesante solicitud de patente china publicada en el año 2015 (30) pone de relieve el hecho (no siempre reconocido) de que la aspersión foliar de nutrientes sobre los cultivos de caña de azúcar es una práctica poco común; esta invención pretende solucionar el problema técnico del suministro foliar de micronutrientes (Mn, B, Fe, Zn), en una preparación que además contiene aminooligosacarinas (quitooligosacarinas) y trinexapac.

Los ensayos realizados permitieron demostrar el efecto sinérgico de la formulación en lo relativo al crecimiento del diámetro internodal de la caña, que genera mayores rendimientos y optimiza costos de fertilización química.

## 7.5 Ananá

El ananá (*Ananas comosus* L.) es una planta perteneciente a la familia de las Bromeliaceae (2700 especies agrupadas en 56 géneros) y es conocida también con el nombre de “piña” o “abacaxi” (en Brasil). Existen 17 variedades de cultivo de *Ananas comosus*.

La planta produce un fruto dulce, de sabor muy agrada-

ble, que alcanza en su desarrollo un peso de aproximadamente 1,5-2 kg/unidad. El cultivo de ananá se desarrolla en regiones tropicales o subtropicales, temperaturas óptimas de entre 21-27°C (18-45°C), en regiones que no presentan heladas (31) (32). En Latinoamérica, los países que producen ananá a gran escala son Ecuador, Paraguay, Bolivia, Brasil y otros, pero su cultivo se extiende a países del sudeste asiático (Tailandia, Vietnam) y China, México, Filipinas (32). Lamentablemente, a pesar de que en la República Argentina el cultivo del ananá se practica en la provincia de Misiones, “en nuestro país no se cuenta con antecedentes de investigaciones científicas en el cultivo de ananá, la única información disponible en nuestra región deriva de material didáctico realizado por profesionales del INTA EEA Montecarlo, Misiones” (cita textual perteneciente a la autorizada fuente bibliográfica generada por Leguizamón y colaboradores (32)). En este sentido, una de las aspiraciones del presente autor, en la medida de sus posibilidades, es estimular las investigaciones en el uso de oligosacarinas en cultivos de ananá, de forma de poder extender su producción a zonas subtropicales de Argentina, ubicadas al sur de la provincia de Misiones, con los beneficios económicos para las poblaciones rurales autóctonas.

El ananá se produce entre el nivel del mar y altitudes inferiores a los 900 metros snm, con alta luminosidad (lo que estimula el crecimiento y la buena calidad del fruto) y con elevado caudal de precipitaciones. Un defecto en la disponibilidad de agua retarda el crecimiento, mientras que un exceso (mayor a 1500 mm anuales) genera una pobre calidad de fruto, con elevada acidez y poco tenor de azúcares (33).

De manera que el cultivo de ananá necesita un régimen regular de precipitaciones (1000-1500 mm anuales) y un medio ambiente con elevada humedad. Es un cultivo fuertemente dependiente de la fertilidad del suelo y es habitual que cuando se produce cada recolección, se fertilice el terreno con N-P-K, CaO y MgO: las extracciones de nutrientes por hectárea cultivada, con un rendimiento de 55 toneladas de fruto son 205 kg N, 393 kg  $K_2O$ , 42 kg MgO, 121 kg CaO y 58 kg de  $P_2O_5$  (34). Sin embargo, también es una práctica documentada la aplicación de fitohormonas para la inducción de la floración (ácido naftalenacético; ácido 2 cloroetil fosfórico) (33). Con respecto a la ya citada fertilización nitrogenada convencional, permite verificar que un buen aporte de N (aprox. 200 kg N / ha) garantiza altos rendimientos y buena calidad del fruto, en particular cuando se realiza la aspersión floral con urea (aún en suelos con alto tenor de  $Al^{+++}$  y bajo contenido de P) (35).

Izquierdo y colaboradores (28) han documentado el empleo de brassinoesteroides en el cultivo “in vitro” (biorreactores) de ananá y Moya et al., ensayan la aplicación de oligosacarinas pécticas en asociación con brassinoesteroides en la micropropagación de ananá (36). La multiplicación “in vitro” del ananá bajo la influencia de oligosacarinas pécticas ha sido estudiada por Rodríguez et al (37).

En el cultivo de ananá, las oligosacarinas se suelen administrar acompañadas de fertilizantes N-K, administrándose bajo la forma de aspersión foliar (incluso vía aplicaciones aéreas) a razón de 140-280 g de oligosacarinas puras / ha (7).



## 7.6 Banano

El banano es originario del Asia Meridional Tropical y las principales variedades comerciales son *Musa paradisiaca* y *Musa sapientum*; la producción mundial de banana sigue en aumento (106 millones de toneladas en el año 2015) y el grueso de esta producción (85%) proviene de pequeñas parcelas de trabajo y producción familiar (en muchos casos, con fines de autoconsumo) (38). Se cultiva en China, India, Filipinas, Brasil, Ecuador, Colombia, Costa Rica, México y Argentina (provincias de Formosa, Jujuy y Salta) (38).

Crece en suelos de estructura franco arenosa, franco arcillosa, franco arcillo-limosa, con alta fertilidad, buen drenaje interno y de profundidades 1,2 – 1,5 m (39). El clima preferencial de crecimiento de esta planta es el tropical húmedo, con temperaturas de 18-35°C y hasta de 40°C, con aceptable provisión de agua (120-150 mm de lluvia mensual, 44 mm semanales) (39). Los sistemas aconsejados para la fertilización del banano descansan sobre el suministro de los elementos ya bien conocidos (N P K y elementos menores). De estos macronutrientes, el K es el elemento más importante para la nutrición del banano. Su suministro se efectúa bajo la forma de sus sales: KCl, KNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a razón de 80-1000 kg K / ha / año. El P es importante, pero los requerimientos de este elemento por parte del vegetal no son grandes. Suministrado bajo la forma de superfosfato triple o fosfato mono o diamónico, la dosis debe ser ajustada entre valores que están comprendidos entre 0-130 kg P / ha / año. El N es sumamente importante para el desarrollo del vegetal. Se lo suministra bajo la forma de urea o de sulfato de amonio (con el inconveniente de que este último es fuertemente ácido);

la urea (46% N) ha sido aplicada con éxito en solución 5% por aspersión foliar (40) (41).

Las excelentes referencias bibliográficas citadas, empero, no señalan la utilidad de las oligosacarinas en el cultivo del banano, aunque su importancia parece bien documentada.

Se ha empleado Pectimorf® (oligogalacturónido obtenido de pectina de citrus, con una distribución molecular comprendida entre cadenas que contienen 9-16 restos monoméricos de ácido galacturónico; ver 2.1) para el cultivo in vitro del banano y posterior trasplante a condiciones ambientales; con ese objeto se utilizó el oligogalacturónido citado embebiendo las raíces del vegetal antes de su plantación y posterior administración foliar (oligogalacturónido en concentración de 1-10 mg / l) luego de medio mes de trasplantado el vegetal; se ha comprobado que la planta así tratada alcanza mayor altura y número de hojas, así como una mejora en la tasa de supervivencia (42) (43). El citado oligómero en conjunción con brassinoesteroides ha demostrado presentar fuerte actividad en todas las etapas de crecimiento del banano (28).

Las dosis recomendadas para la fertilización del banano con oligosacarinas resulta ser de 0,5-2 l / ha, de una solución comercial que contiene 142 g / litro (7), adecuadamente diluida en agua para fertilización foliar, siendo ésta una práctica bien recomendada (7).

Existen en el mercado preparados comerciales que incluyen en su fórmula componentes de vinazas de caña de azúcar y oligosacarinas específicas, lo que constituye una excelente composición (44), cuya administración foliar al banano está indicada en 2-3 l de producto / ha.

En resumen, existiendo estudios documentados sobre la utilidad de las oligosacarinas en el cultivo del banano y productos comerciales fácilmente asequibles, es de esperar que el uso de oligosacarinas se incremente en la aplicación a los cultivos tropicales, con las ventajas ya expuestas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Guidelines for coffee growing (no date).  
[www.smart-fertilizer.com/articles/guidelines-of-coffee-growing](http://www.smart-fertilizer.com/articles/guidelines-of-coffee-growing) (downloaded 2017-06-02)
- 2) Valencia-Aristizábal, G. (1999). Fisiología, nutrición y fertilización del cafeto. Int. Plant Nutrition Institute, IPNI (fed. Nac. Cafeteros Colombia ed; ISBN 978-958-96554-4-3).  
[http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085e-d5f091b1b852579000057902e/0ae8c9d4887c66dd05257a6a00759a32/\\$FILE/Fisiologiacafeto.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085e-d5f091b1b852579000057902e/0ae8c9d4887c66dd05257a6a00759a32/$FILE/Fisiologiacafeto.pdf).
- 3) Instituto del Café de Costa Rica (2011). Guía Técnica para el Cultivo del Café (1a. Edición, ICAFE-CICA-FE; ISBN 978-9997-55-041-4).  
[www.icafe.cr/wp-content/uploads/cicafe/documentos/GUIA-TECNICA-V10.PDF](http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/cicafe/documentos/GUIA-TECNICA-V10.PDF).
- 4) Anacafé®. Asoc. Nac. del Café (Guatemala) (sin fecha). Fertilización del cafeto.  
[https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Fertilizacion\\_del\\_cafeto](https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Fertilizacion_del_cafeto).
- 5) Khalajabadi, S.S.; Osorio, H.G. (2012). Alternativas generales de fertilización para cafetales en la etapa de producción. Avances Técnicos Cenicafe, 424 (8 páginas).  
[www.cenicafe.org/es/publications/avt04241.pdf](http://www.cenicafe.org/es/publications/avt04241.pdf).
- 6) Yara (sin fecha). Nutrición vegetal: Café.  
[www.yara.com.co/crop-nutrition/crops/cafe/](http://www.yara.com.co/crop-nutrition/crops/cafe/).
- 7) Agrícola Grial S.A. (2012). Ficha Técnica: Kendal - Bioestimulante con acción nutricional y mejoramiento de las defensas.

- <http://www.agrialcr.com/wp-content/uploads/2012/04/FICHA-TECNICA-KENDAL.pdf>.
- 8) Van, S.N.; Minh, H.D.; Dzung, N.A. (2013). "Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house". *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2: 289-294.  
doi: 10.1016/j.bcab.2013.06.001.
  - 9) Cabrera, J.C.; Wegria, G.; Onderwater, R.C.A.; González, G. and others (2013). "Practical use of oligosaccharins in agriculture". *Acta Horticulturae* 1009: 195-212.  
doi: 10.17660/ActaHortic.2013.1009.24.  
[https://www.researchgate.net/profile/Gustavo\\_Cabrera7/publication/257780559\\_Developing\\_application\\_for\\_oligosaccharins\\_in\\_agriculture/links/55411b9f0cf-2718618dc9a35.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_Cabrera7/publication/257780559_Developing_application_for_oligosaccharins_in_agriculture/links/55411b9f0cf-2718618dc9a35.pdf).
  - 10) Paredes Arce, M. (2003). Manual de cultivo de cacao (Programa de desarrollo de la Amazonia, PROAMAZONIA, Min Agricultura, Perú.  
[www.infocafes.com/descargas/biblioteca/215.pdf](http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/215.pdf).
  - 11) Estrada, W.G.; Romero Castellano, X.G.; Moreno Peraza, J.A. (2011). Guía técnica del cultivo del cacao manejado con técnicas agroecológicas (CATIE-CONFRAS).  
[http://biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada\\_et\\_al\\_Guia\\_Tecnica\\_Cacao.pdf](http://biblioteca.catie.ac.cr/descargas/Estrada_et_al_Guia_Tecnica_Cacao.pdf)
  - 12) Prastowo, E.; Yuniasih, E.E.; Baon, J.B. (2013). "Effects of agricultural practices on soil organic nitrogen fractions in an inceptisol of a cocoa plantation". *J. Agric. Sci. Technol.* A3: 878-885.  
[www.davidpublishing.com/davidpublishing/Upfile/12/25/2013/2013122570005625.pdf](http://www.davidpublishing.com/davidpublishing/Upfile/12/25/2013/2013122570005625.pdf).

- 13) Abdoellah, S. (2009). "Fertilizers application on cocoa plantation in Indonesia: pricing policy and sustainability goal". *Malaysian Cocoa J.* 5: 20-23.  
[www.koko.gov.my/lkm/getfile.asp?id=5069](http://www.koko.gov.my/lkm/getfile.asp?id=5069).
- 14) Hardy, F. (1960). *Cacao Manual* (English edition. Interam. Inst. Agricultural Sci., Costa Rica): 70-83.  
<http://orton.catie.ac.cr/REPDOCA8425E/A8425E.PDF> (en español).
- 15) Saborio, F. (2011). "Oligosacarinas" (Escuela de Agronomía, Univ. de Costa Rica), 27 pp.  
<https://franciscosaborio.files.wordpress.com/2011/11/oligosacarinas-word.pdf>.
- 16) Díaz, A.; Velásquez, R.; Chirinos, M. (2009). "Efecto del tamaño del botón floral sobre la inducción de embriones somáticos en cacao". *Agronomía trop.* 59(4): 481-489.  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2009000400012&Ing=es&ting=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000400012&Ing=es&ting=es)
- 17) Rodríguez, A.; Remberto, F. (2010). "Evaluación de cuatro bioestimulantes comerciales en el desarrollo de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao* L.). Cultivar nacional". Tesis Ing. Agronómica (Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador).  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/319>.
- 18) Ramos-Hernández, L.; Arozarena-Daza, N.J.; Leisacalle-Acosta, J.; Castañeda-Hidalgo, E. y otros (2014). "Dosis de FitoMas®-E para el enraizamiento de esquejes de guayaba var. Enana Roja Cubana". *Ciencia ergo-sum* 21(2): 133-139.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10431177004>.

- 19) Barroso Frómeta, L.; Michel, M.A.; Rodríguez-Hernández, P.; Jerez-Mompié, E. (2015). “Aplicación de FitoMas-E y EcoMic® para la reducción del consumo de fertilizante mineral en la producción de posturas de cafeto”. *Cultivos Tropicales* 36(4): 158-167.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362015000400021](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000400021).
- 20) Villar-Delgado, J.; Montano-Martínez, R.; García-Martínez, T.; García-González, D.; Zuaznábar-Zuaznábar, R. (2011). “Efectos del bionutriente FITOMAS-E con y sin fertilización convencional”. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 45(3): 24-29.  
<http://www.redalyc.org/pdf/2231/223122261004.pdf>.
- 21) Sitinjak, R.R.; Pandiangan, D. (2014). “The effect of plant growth regulator triacontanol to the growth of cacao seedlings (*Theobroma cacao* L.)”. *Agrivita* 36(3): 260-267.  
 doi: 10.17503/Agrivita-2014-36-3-260-267.  
[https://www.researchgate.net/publication/273451623\\_The\\_effect\\_of\\_plant\\_growth\\_regulator\\_triacontanol\\_to\\_the\\_growth\\_of\\_Cacao\\_seedlings\\_Theobroma\\_cacao\\_L](https://www.researchgate.net/publication/273451623_The_effect_of_plant_growth_regulator_triacontanol_to_the_growth_of_Cacao_seedlings_Theobroma_cacao_L).
- 22) Pérez Zamora, F. (2006). “Fertilización de la caña de azúcar” en “Manual de Fertilidad de Suelos y Uso de Fertilizantes” (N. Darwich. Fertilizer Asoc. Civil. III Edición, ISBN 987-43-9313-0): 258-264.
- 23) Ridge, R. (2013). *Fertilizing for high yield and quality - Sugarcane*. IPI Bulletin No. 21 (International Potash Institute. ISBN 978-3-905887-06-8).

- doi: 10.3235/978-3-905887-06-8.  
<https://www.ipipotash.org/udocs/414-ipi-bulletin-no21-sugarcane-2013.pdf>.
- 24) Indorama Fertilizer (no date). Crop Management Practices – Sugarcane, 6 pp.  
<http://www.indoramafertilizers.com/image/crop-practice-sugarcane.pdf>.
- 25) Macedo, I. de C. (Organizer) (2007). “Sugar Cane’s Energy. Twelve studies on Brazilian Sugar Cane Agribusiness and its Sustainability” (UNICA, Sao Paulo Sugar Cane Agroindustry Union (Berlendis Editores Ltda.): 162-175.  
<http://sugarcane.org/resource-library/books/Sugar%20Canes%20Energy%20-%20Full%20book.pdf>.
- 26) Falcón Rodríguez, A.B.; Costales Menéndez, D.; González-Peña Fundora, D.; Nápoles García, M.C. (2015). “Review – New natural products for agriculture: the oligosaccharins”. *Cultivos Tropicales* 36: 111-129.  
<http://www.redalyc.org/html/1932/193243640010/>.
- 27) Hien, N.Q. (2009). “Study of chemical treatment combined with radiation to prepare biotic elicitor for utilization in agriculture”. Report of the 2nd RCM on Development of Radiation Processed Products of Natural Polymers for Application in Agriculture, Industry and Environment. Reims, France, 12-16.  
[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/46/015/46015348.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/46/015/46015348.pdf)
- 28) Izquierdo, H.; Diosdado, E.; González Cepero, M.C.; Núñez, M. de la C.; Cabrera, J.C. and others (2016). “Contributions to knowledge of the functioning of na-



- tional biostimulators in plant biotechnology processes”. *Biotecnología Aplicada* 33: 3511-3516.  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2016/ba163h.pdf>.
- 29) Pujos, P. (2013). “Protection of plants against their pathogenic agents”. U.S. Patent 8609084 B2.
  - 30) Chinese Patent Appl. CN 104276891 A (2015). “Foliage fertilizer containing aminooligosaccharins” (also published as CN 104276891 B).
  - 31) García Suárez, M.D.; Serrano, H. (2005). “La piña, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso”. *ContactoS* 56: 55-61.  
<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n56ne/pina.pdf>.
  - 32) González-Leguizamón, R.; Chabbal, M.; Domínguez, S.; Alayón Luaces, P. (2013). “Ciclo vegetativo de plantas de ananá (*Ananas comosus* L. Merr.) bajo dos sistemas de cultivo en Corrientes”. *FACENA* 29: 11-22.  
<http://exa.unne.edu.ar/revisfacena/29/11-22.pdf>.
  - 33) Piña (1991). Sin autor, en: Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica (Dirección Nac. Inv. Extensión Agrícola. Min. Agric. Ganad., Costa Rica).  
[http://www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/tec-pina.pdf](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-pina.pdf).
  - 34) El Cultivo de la Piña (sin fecha, bajado de la web el 28-7-2017). [infoagro.com](http://infoagro.com).  
[www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/pina.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/pina.htm).
  - 35) Betancourt, P.; Montilla, I.; Hernández, C.; Gallardo, E. (2005). “Fertilización nitrogenada en el cultivo

- de piña (*Ananas comosus* L. Merr.) en el sector Páramo Negro, Municipio Iribarren, Estado de Lara. Rev. Fac. Agron. 22(4) Caracas (8 pp).  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182005000400006](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182005000400006).
- 36) Moya, M.; Isidró, M.; Rodríguez, D.; Valera, E. (2006). “Efecto de Pectimorf® y el Biobras-16 en la micropropagación de la piña (*Ananas comosus* L. Merr.)” en: Taller de productos bioactivos. Taller Internacional de Oligosacarinas. INCA (4: 2006: La Habana).
- 37) Rodríguez, D. et al (2004). “Influencia del Pectimorf® en la multiplicación in vitro de la piña (*Ananas comosus* L.)”. Taller de Productos bioactivos. Congreso Científico del INCA (14: 2004, nov. 9-12), La Habana).
- 38) Albino Molina, N. (2016). “La producción de frutas tropicales: panorama mundial y en Argentina”. INTA-Estación Experim. Agropec. Bella Vista, Hoja de Divulgación No. 42.  
[https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_hd42\\_frutas\\_tropicales\\_0.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_hd42_frutas_tropicales_0.pdf).
- 39) Fagiani, M.J.; Tapia, A.C. (2013). Ficha del cultivo del banano. INTA Yuto-Jujuy. 3 pp.  
[https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cultivo\\_del\\_banano.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-cultivo_del_banano.pdf).
- 40) López, A.; Espinosa, J. (1995). “Manual de nutrición y fertilización del banano: una visión práctica del manejo de la fertilización” (Int. Plant Nutr. Institute, Quito, Ecuador).  
[http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085e-d5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe-05257a40005f359f/\\$FILE/N%20F%20Banano.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085e-d5f091b1b852579000057902e/c093707b0327c2fe-05257a40005f359f/$FILE/N%20F%20Banano.pdf).

- 41) Espinosa, J.; Mite, F. (2015). “Estado actual y futuro de la nutrición y fertilización del banano” *Informaciones Agronómicas* 48: 8 pp.  
[http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f-091b1b852579000057902e/02788fd8caef69705257a-370058dad2/\\$FILE/Estadobanano.pdf](http://nla.ipni.net/ipniweb/region/nla.nsf/e0f085ed5f-091b1b852579000057902e/02788fd8caef69705257a-370058dad2/$FILE/Estadobanano.pdf).
- 42) Izquierdo, H.; González, M.C.; Núñez, M.; Proenza, R.; Cabrera, J.C (2009). “Influencia de un oligogalacturónido en la aclimatación de vitroplantas de banano (*Musa spp*) del clon “FHIA-18” (AAAB)”. *Cultivos Tropicales* 30(1): 37-42.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362009000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362009000100005).
- 43) Rodríguez, D. (2000). “Influencia del Pectimorf® en la multiplicación in vitro del plátano (*Musa sp*)”. I Taller de Productos Bioactivos. Congreso Científico del INCA (Nov 2000, La Habana).
- 44) Kimel de Colombia S.A. (sin fecha). *Mol Algae. Fertilizante orgánico mineral líquido (hoja técnica)*.  
[http://www.kimeldecolumbia.com/agro\\_ind/MOL%20ALGAE.pdf](http://www.kimeldecolumbia.com/agro_ind/MOL%20ALGAE.pdf).

## APÉNDICE

### Aplicación de oligosacarinas a los cultivos frutícolas, hortícolas y ornamentales

| CULTIVO    | OLIGOSACARINA       | APLICACIÓN          | DOSIS        | BIOACTIVIDAD                                             | REF. BIB.                   |
|------------|---------------------|---------------------|--------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Fruticola  | --                  | --                  | --           | --                                                       | (1) (linea-<br>miento guía) |
| Fruticola  | No declarada        | Foliar              | 2,5-3 l/ha   | Promoción crecimiento                                    | (2)                         |
| Guayaba    | oligogalacturónidos | --                  | 10-40 ppm    | Enraizamiento de esquejes                                | (3)                         |
| Uva        | alginoligosacarinas | Foliar              | 200-300 g/hl | Enaltecedor del metabolismo                              | (4)                         |
| Uva        | oligogalacturónidos | Foliar              | 2000 ppm     | Mayor contenido de antocianinas                          | (6) (7)                     |
| Mango      | QOS                 | Cobertura del fruto | --           | Antimicrobiano                                           | (5)                         |
| Ciruela    | QOS                 | Cobertura del fruto | 2,5%         | Prolongación tiempo almacenamiento                       | (8)                         |
| Papaya     | QOS                 | Cobertura del fruto | 5g/l         | Prolongación tiempo almacenamiento                       | (9)                         |
| Fresa      | QOS                 | --                  | --           | Prolongación tiempo almacenamiento                       | (10)                        |
| Citricos   | Oligogalacturónidos | In vitro            | 10 ppm       | Bioestimulación                                          | (11)                        |
| Hortícolas | Extracto Algas      | --                  | --           | Diversa                                                  | (12)                        |
| Espinaca   | Alginoligosacarinas | Foliar              | 20-100ppm    | Aumento enraizamiento, masa aérea y tenor de polifenoles | (13)                        |
| Repollo    | Alginoligosacarinas | Foliar              | 20-100ppm    | Idem                                                     | (13)                        |
| Tomate     | Alginoligosacarinas | Foliar              | 20-100ppm    | Idem                                                     | (13)                        |

| CULTIVO       | OLIGOSACARINA       | APLICACIÓN                          | DOSIS      | BIOACTIVIDAD                                                    | REF. BIB.           |
|---------------|---------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| Tomate        | Carragenanos        | Foliar                              | 20-100ppm  | Aumento rendimiento y tenor de clorofila                        | (13)                |
| Tomate        | QOS                 | Foliar                              | 20-100ppm  | Idem                                                            | (13) (14)           |
| Tomate        | Oligogalacturónidos | Imbibición semillas + aplic. foliar | --         | Aumento enraizamiento y masa aérea                              | (17) (20) (22)      |
| Lechuga       | Carragenanos        | Foliar                              | --         | Aumento rendimiento y tenor de clorofila                        | (13)                |
| Lechuga       | QOS                 | Foliar                              | --         | Idem                                                            | (13)                |
| Lechuga       | Oligogalacturónidos | Foliar                              | --         | Aumento enraizamiento y masa aérea                              | (16)                |
| Pimiento Rojo | QOS                 | Inmersión semillas+ aplic. foliar   | 50-100 ppm | Promoción de la germinación, enraizamiento y longitud radicular | (14) (15) (18) (19) |
| Zucchini      | QOS                 | Cobertura del fruto                 | --         | Promoción germinación y tiempo de almacenamiento                | (21)                |
| Orquideas     | QOS                 | Foliar                              | 10-600 ppm | Estimulación del crecimiento, calidad de la floración, fresca   | (23)                |
| Gladiolos     | QOS                 | Foliar                              | 10-300ppm  | Estimulación del crecimiento; número de hojas y flores          | (24)                |
| Violetas      | Oligogalacturónicos | Foliar                              | --         | Promoción del enraizamiento                                     | (25)                |
| Clavel        | QOS                 | Foliar                              | 100 ppm    | Estimulación de la germinación de semillas y de la coloración   | (26)                |

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Gobierno Departamental Autónomo. Santa Cruz (2011). Cultivos Frutícolas – Fruticultura, 81 pp.  
[http://www.sicsantacruz.com/Biblioteca/01\\_PDF/06\\_fruticultura/0106002/010600201.pdf](http://www.sicsantacruz.com/Biblioteca/01_PDF/06_fruticultura/0106002/010600201.pdf).
- 2) Valagro® (2014). Kendal®. Vademécum Agrícola 2014.  
<http://manualzilla.com/doc/6192258/fertilizantes>.
- 3) Ramos Hernández, L.; Arozarena Daza, N.J.; Lescaille Acosta, J.; García Cisneros, F. y otros (2013). “Dosis de Pectimorf® para enraizamiento de esquejes de guayaba var. Enana Roja Cubana”. Revista Mexicana de Cs. Agrícolas 4(6): 1093-1105.  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4nspe6/v4spe6a2.pdf>.
- 4) Agriges Ibérica (2014). Catálogo de Productos: ASKO L50®: 56. <http://www.agriges.com/UserFiles/File/catalogo-productos-agriges-iberica.pdf>.
- 5) Quynh, T.M. (2014). “Radiation processing of bio-polymers for agriculture applications” in “Radiation Processed Materials in Products from Polymers for Agricultural Application” (Int. Atomic Energy Agency, IAEA. IAEA-TECDOC-1745): 196-204.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).
- 6) Ochoa, V.M.; Vargas, A.I.; Islas, M.A.; González, A.G.; Martínez, T.M. (2011). “Pectin-derived oligosaccharides increase color and anthocyanin content in flame seedless grapes. J. Sci. Food Agric. 91(10): 1928-1930.  
doi: 10.1002/jsfa.4412.

- 7) Martínez Tellez, M.A.; Vargas Aispuro, I. del C. (2011). "Method for controlling coloration in table grapes based on oligogalacturonides". U.S. Patent Appl. 2011/0281728 A1 (also published as Eur. Patent Appl. 2351478 A1. WO Patent Appl. 2010044649 A1).
- 8) Bautista Baños, S.; Hernández López, M.; Guillén Sánchez, D.; Tejacal, I.A. (2006). "Influencia del recubrimiento con quitosano y la temperatura de almacenamiento en la calidad post-cosecha y niveles de infección en la ciruela mexicana". Rev. Iberoam. Tecnol. Postcosecha 7(2): 114-121.  
<http://www.redalyc.org/pdf/813/81370207.pdf>.
- 9) Dotto, G.L.; Vieira, M.L.G.; Pinto, L.A.A. (2015). "Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature". LWT-Food Sci. Technol. 64(1): 126-130. doi: 10.1016/j.lwt.2015.05.042.
- 10) Campos Rosillo, S. (2014). "Recubrimientos biodegradables de biopolímeros para su aplicación en frutas". Trabajo de fin de grado. Ciencia y Tecnol. Alim. Univ. Politécnica de Valencia.  
[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46173/TFC%20Sergio%20Campos\\_SEPTIEMBRE%202014.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/46173/TFC%20Sergio%20Campos_SEPTIEMBRE%202014.pdf?sequence=1).
- 11) Bao Fundora, L.; Hernández Ortiz, R.M.; Diosdado Salcés, E.; Román Gutiérrez, M.I. y otros (2013). "Embriogénesis somática de *Citrus macrophylla* Wester con el empleo de Pectimorf® y análogos de brasino esteroides". Rev. Colombiana de Biotecnol. 15(1): 6 pp.  
<http://www.redalyc.org/pdf/776/77628609021.pdf>.

- 12) Ag Biotech Inc. (no date). "Vitazyme in various crops in Latin America & the Caribbean": 158 pp.  
[www.agbioinc.com](http://www.agbioinc.com).
- 13) Smolko, E.; Cerchiatti, L.; Clozza, M.; Giardina, E.B. and others (2014). "Radiation processing of marine algal polysaccharides as plant growth promoters" in "Radiation processed materials in products from polymers for agricultural application". Int. Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC-1745: 19-25.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).
- 14) Haque, M.; Dafader, N.C.; Sultana, S.; Mallah, M.Z.I.; Mandal, M.M.A. (2014). "Overview of the activities on radiation processing of polymeric materials in Bangladesh" in "Radiation processed materials in products from polymers for agricultural applications". Int. Atomic Energy Agency, IAEA-TECDOC-1745: 26-34.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).
- 15) Darwis, D.; Puspitasari, T.; Iramani, D.; Susilowati, S.; Pangerteni, D. (2014). "Preparation of low molecular weight chitosan by radiation and its application for plant growth promoter" in "Radiation Processed Materials in Products from Polymers for Agricultural Applications". Int. Atomic Energy Agency. IAEA-TECDOC-1945: 86-98.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).
- 16) Terry Alfonso, E.; Ruiz Padrón, J.; Tejeda Peraza, T.; Reynaldo Escobar, I.; Díaz de Armas, M.M. (2011).



- “Respuesta del cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) a la aplicación de diferentes productos bioactivos”. Cultivos Tropicales 32(1): 28-37.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362011000100003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362011000100003).
- 17) Plana, D.; Álvarez, M.; Florido, M.; Lara, R.M.; Cabrera, J.C (2003). “Actividad biológica del Pectimorf en la morfogénesis in vitro del tomate (*Lycopersicum esculentum*, Mill.) variedad Amalia”. Cultivos Tropicales 24(1): 29-33.  
<http://www.redalyc.org/pdf/1932/193218114004.pdf>.
- 18) Calderón Aguirre, C. (2013). “Evaluación in vitro del brasinoesteroide BB-6 y del oligosacárido Pectimorf en *Capsicum annuum* L. variedad jalapeño M.” Tesis de Maestría en Biotecnología de Plantas (Univ. Veracruzana).  
<http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/39889>.
- 19) Tamada, M.; Taguchi, M.; Bin Hashim, K.; Nguyen, Q.H. (no date). “FNCA Guidelines – On chitosan PGP applications for rice, chilli and other crops”: 29-48.  
[http://www.fnca.mext.go.jp/english/eb/eb\\_guideline.pdf](http://www.fnca.mext.go.jp/english/eb/eb_guideline.pdf).
- 20) Chen, Ch.; McIver, J.; Yang, Y.; Bai, Y.; Schultz, B.; McIver, A. (2006). “Foliar application of lipo-chitoooligosaccharides (Nod factors) to tomato (*Lycopersicum esculentum*) enhances flowering and fruit production”. Can. J. Plant Sci. 87: 365-372.  
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.4141/P06-164>.
- 21) Lárez Velázquez, C.; Chirinos, A.; Tacoronte, M.;

- Mora, A. (2012). "Chitosan oligomers as bio-stimulants to zucchini (*Cucurbita pepo*) seeds germination". Agriculture (Poľnohospodarstvo) 58(3): 113-119.  
<http://www.saber.ula.ve/bits-tream/123456789/38852/1/original%20Agriculture%20chitosan%20calabac%C3%ADn.pdf>.
- 22) García Sahagún, M. L.; Martínez Juárez, V.; Avendaño López, A.N.; Padilla Sahagún, M. del C.; Izquierdo Oviedo, H. (2009). "Acción de oligosacáridos en el rendimiento y calidad del tomate". Rev. Fitotec. Mex. 32(4): 295-301.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802009000400008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000400008).
- 23) Uthairatanakij, A.; Teixeira da Silva, J.A.; Obsuwan, K. (2007). "Chitosan for improving orchid production and quality". Orchid Sci. Biotechnol. 1(1): 1-5 (Global Science Books).  
[https://www.researchgate.net/profile/Jaime\\_Teixeira\\_Da\\_Silva/publication/283515183\\_Chitosan\\_for\\_Improving\\_Orchid\\_Production\\_and\\_Quality/links/563cdf1808ae8d65c0117395.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jaime_Teixeira_Da_Silva/publication/283515183_Chitosan_for_Improving_Orchid_Production_and_Quality/links/563cdf1808ae8d65c0117395.pdf).
- 24) Habib, U.; Ahmed, N.; Zahid, S.; Yasin, T. (2014). "Influence of irradiated chitosan on growth and flower quality of gladiolus at different sowing dates and synthesis of radiation cross-linked poly(acrylic acid) hydrogel for agriculture applications" in "Radiation Processed Materials in Products from Polymers for Agricultural Applications" (Int. Atomic Energy Agency, IAEA. IAEA-TECDOC-1745): 127-135.  
[http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745\\_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/TE-1745_web.pdf).

- 25) Falcón, R.; Cabrera, J.C. (2007). “Actividad enraizadora de una mezcla de oligogalacturónidos en pecíolos de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*)”. Cultivos Tropicales 28(2): 87-90.  
<http://www.redalyc.org/pdf/1932/193217731012.pdf>.
- 26) Hernández Remigio, M.; Ramírez Arrebato, M.A.; Rodríguez Zenén, G. (2002). “Efecto de la aplicación de quitosana en la germinación y crecimiento del clavel (*Dianthus carioophyllus* L.)”. CIGET Pinar del Río 4(2): 4 pp.  
<http://www.ciget.pinar.cu/Revista/No2002-2/clavel.htm>.

### **Observación del autor:**

A la fecha del 15 de agosto del 2017, no se ha podido encontrar bibliografía científica específica respecto de la aplicación de oligosacarinas a los cultivos de rosal, crisantemo y tulipán, por lo menos, tanto como le consta al que suscribe.

*Víctor Bautista Díaz*

LIBRO EDITADO POR



EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA





**El autor:** Víctor Bautista Díaz, argentino, Licenciado en Química, posee 45 años de experiencia en la industria químico-farmacéutica (42 de los mismos, exclusivamente en laboratorios de Investigación y Desarrollo). Cuenta en su haber con 26 patentes concedidas, tres libros de carácter técnico y otras publicaciones científicas. Actualmente retirado, actúa como consultor químico, con marcada inclinación al estudio del aprovechamiento y transformación técnica de residuos agroindustriales en materiales útiles, minimizando el impacto ambiental que supone su volcado.

**El Libro:** El presente libro fue pensado y escrito para estudiantes y graduados de las carreras de Bioquímica Técnica, Química y Agronomía, así como para químicos industriales que se enfrenten al desafío de desarrollar métodos de obtención de estos preciados moduladores del crecimiento vegetal (oligosacarinas), y su fabricación a escala técnica. Por extensión, el libro también provee información para quien encare la tarea de preparación, purificación y fraccionamiento de todo tipo de oligosacáridos por métodos químicos, aportando útiles detalles de laboratorio y fabricación. Por último la obra proporciona valiosa documentación para el agrónomo responsable de la aplicación de oligosacáridos a los cultivos vegetales.

