

Cinco tópicos de interés en la Industria Bioquímico-Farmacéutica

VÍCTOR BAUTISTA DÍAZ



**Cinco tópicos
de interés en la Industria
Bioquímico-Farmacéutica**

VÍCTOR BAUTISTA DÍAZ

Cinco tópicos de interés en la Industria Bioquímico-Farmacéutica



EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA

Díaz, Víctor Bautista

Cinco tópicos de interés en la Industria Bioquímico-Farmacéutica / Víctor Bautista Díaz.- 1a ed
.- Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Autores de Argentina, 2020.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-87-0732-7

1. Informes Técnicos. 2. Industria Química. I. Título.

CDD 572.3

EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA

www.autoresdeargentina.com

Mail: info@autoresdeargentina.com

Víctor Bautista Díaz

www.victorbautistadiazquimico.com

consultaspronaved@gmail.com

Queda hecho el depósito que establece la LEY 11.723

Impreso en Argentina – *Printed in Argentina*

*Dedicado a Eliana y a Ana María (†)
con profundo amor y gratitud.*

ÍNDICE

Acerca del Autor.....13

Prólogo.....15

Tópico 117

Actividad del peróxido de hidrógeno sobre los polisacáridos en general y sobre
heparina en particular; generación de alteraciones estructurales características

1.1) Revisión del arte previo: antecedentes bibliográficos del tema.....19

1.2) LMWH y oligosacáridos relacionados obtenidos por métodos
de fragmentación radicalaria: patrones estructurales característicos24

1.3) Referencias bibliográficas.....31

Tópico 2.....39

Expansores plasmáticos de base proteica. Producción Química

2.1) Introducción y revisión de antecedentes bibliográficos41

2.2) Expansores plasmáticos obtenidos de proteínas animales exceptuando
hemoglobinas y gelatinas44

2.3) Expansores plasmáticos obtenidos a partir de hemoglobina animal:.....46

2.4) Expansores plasmáticos obtenidos a base de gelatina48

2.5) Expansores plasmáticos obtenidos a base de proteínas vegetales49

Referencias bibliográficas.....50

Tópico 3.....53

Complejos Orgánicos y Quelatos de Microelementos útiles en Sanidad Animal.
Producción Química

3.1) Introducción55

3.2) Hierro59

3.2.1) Importancia del Hierro en la sanidad animal.....59

3.2.2) Métodos de obtención de complejos férricos y ferrosos destinados a la sanidad animal:.....	62
3.2.2.1) Complejos coloidales hierro-carbohidrato:	62
3.2.2.2) Complejos con aminoácidos químicamente puros:	62
3.2.2.3) Complejos con oligopéptidos y proteínas de diverso origen (proteínatos de hierro)	64
3.2.2.4) Sales complejos de ácidos carboxílicos:	67
3.3) Cobre y Zinc	68
3.3.1) Importancia de Cu y Zn en la sanidad animal:	68
3.3.2) Métodos de obtención de complejos de cobre y zinc destinados a la sanidad animal:.....	70
3.3.2.1) Complejos metal-carbohidratos:	70
3.3.2.2) Complejos con aminoácidos puros.....	73
3.3.2.3) Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos de cobre y zinc):.....	74
3.3.2.4) Sales y complejos de ácidos carboxílicos:	74
3.4) Manganeso y Cobalto	76
3.4.1) Importancia del Manganeso y Cobalto en sanidad animal:	76
3.4.2) Métodos de obtención de complejos de Manganeso y Cobalto destinados a la sanidad animal:.....	76
3.5) Molibdeno y Selenio.....	77
3.5.1) Importancia del molibdeno y selenio en sanidad animal:.....	77
3.5.2) métodos de obtención de complejos de molibdeno y selenio destinados a la sanidad animal:.....	78
3.5.2.1) Complejos mineral-carbohidratos:.....	78
3.5.2.2) Complejos con aminoácidos puros:.....	78
3.5.2.3) Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos):	79
3.5.2.4) Levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)enriquecidas en Mo y Se:	80
3.6) Cromo y Yodo	81
3.6.1) Cromo:	81
3.6.2) Yodo.....	82
Referencias bibliográficas	83

Tópico 4.....	93
Bentonitas y sus aplicaciones en la Industria Bioquímica	
4.1) Objeto del estudio e introducción.....	95
4.1.1) Química, Geología y usos de las bentonitas. Breve descripción	95
4.2) Criterios de activación de bentonitas Bentonitas activadas.....	100
4.3) Aplicaciones de los distintos tipos de bentonita en la Industria Bioquímica	104
4.3.1) Pigmentos y colorantes naturales.....	105
4.3.1.1) Carotenoides y Clorofilas:	105
4.3.1.2) Hemocromógenos y hemoglobina.	111
4.3.2) Polipéptidos, enzimas y hormonas.	113
4.3.2.1) Caso del Citocromo c (Cyt-c).....	114
4.3.2.2) Caso de la urokinasa (UK).	117
4.3.3) Recuperación de compuestos de amonio cuaternario contaminantes de desechos líquidos de naturaleza biológica.....	121
4.3.4) Usos Misceláneos.....	121
Referencias bibliográficas:.....	122
Tópico 5.....	131
CASEINFOSFOPÉPTIDOS. Producción Química	
5.1) Introducción	133
5.2) Producción química de CPP.....	136
Referencias bibliográficas.....	139

ACERCA DEL AUTOR

Víctor B. Díaz es argentino, Licenciado en Química (1978) y Técnico Químico (1967). Su actividad profesional está constituida por:

- 45 años en la industria químico-farmacéutica
- 42 años exclusivamente dedicados al trabajo en laboratorios industriales de estudios, desarrollos e investigaciones químicas.
- 26 años responsable de gerencia de I+D

Sus principales campos de trabajos fueron:

- Drogas complejas biológicas y no-biológicas (BCD, NBCD): heparinas, condroitin sulfato, polisacáridos sulfatados, modificaciones sintéticas: heparinas de bajo peso molecular (LMWH). Fragmentación radicalaria de polisacáridos; métodos propietarios. Complejos nanoparticulados hierro- carbohidrato y hierro-carbohidrato-proteínas: métodos propietarios.
- Síntesis orgánica técnica y farmacéutica; estabilidad de fármacos sintéticos y biológicos.
- Bioquímica Industrial: aislamiento y purificación de productos bioquímicos (ácidos biliares, esteroides, proteínas, enzimas, hormonas, hemo y heminas, polisacáridos, etc.)
- Valorización de desechos proteicos: fertilizantes orgánicos conteniendo promotores de crecimiento vegetal.
- 26 patentes, 5 publicaciones científicas con referato y 6 libros sobre los temas citados; Premio Accésit Fundación Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, UBA, 1989).

PRÓLOGO

En esta obra, el autor ha seleccionado cinco tópicos particulares dentro del área de su experiencia, que es la Química Orgánica/ Bioquímica Farmacéutica y Técnica. El primer tópico reúne información dispersa (pero abundante) sobre la actividad del peróxido de hidrógeno sobre distintos polisacáridos en general y sobre heparina en particular; se ha intentado poner en relieve que la actividad del peróxido de hidrógeno sobre heparina es una particularización de lo que sucede cuando dicho peróxido actúa sobre distintos polisacáridos, de manera que el texto sigue un orden de lo general a lo particular.

El segundo tópico se refiere a la preparación de expansores plasmáticos de base proteica, tema que en la actualidad no ocupa investigaciones de primera línea. El autor ha pretendido rescatar la historia de estas sustancias sumamente utilizadas durante las catástrofes bélicas sucedidas durante el siglo XX, reunir información técnica y actualizar el estado del arte. El autor comparte la creencia que un tema “viejo” no es necesariamente un tema agotado, tal como en este caso lo demuestra la escasez de trabajos sobre expansores basados en proteínas de origen vegetal.

El tercer tópico se ocupa de los métodos de producción química de complejos y quelatos de elementos-traza (microelementos, oligoelementos) utilizados en sanidad animal. La bibliografía sobre el tema es sumamente abundante en lo referido a la fisiología, toxicología y biofarmacología y clínica de estos minerales, pero no lo es tanto a la hora de abordar los métodos técnicos de producción de estos complejos: de hecho, la gran mayoría de esta información sólo se encuentra detallada en la bibliografía de patentes.

El cuarto tópico trata sobre los minerales bentonitas y sus aplicaciones diversas en la Industria Bioquímica, en tanto la inmensa gama de posibilidades que despliegan estas arcillas, dadas sus propiedades tan particulares. Se revisan sus aplicaciones como adsorbentes, decolorantes, tamices moleculares, etc. útiles en el aislamiento y purificación de diversos productos bioquímicos.

El quinto tópico presenta información actualizada respecto de los fosfopéptidos derivados de las caseínas y su moderna aplicación en áreas de la Medicina e industrias de alimentos funcionales y nutraceuticos; se pone el foco en la obtención de estos péptidos a escala industrial.

Esta obra no está dedicada a estudiantes de las carreras de Química o Bioquímica y Farmacia (aunque, por supuesto, no se los excluye). Está pensada como una colaboración para el químico técnico que, actuando en los laboratorios industriales de Desarrollo, se enfrente a la tarea del estudio de obtención y puesta en producción de los productos comprendidos en los temas que aquí se exponen. El autor desea que este objetivo se

cumpla mínimamente, y agradece a la vida la experiencia acopiada durante 45 años de investigaciones industriales en el campo de la Química y Bioquímica Farmacéutica. Al respecto, el autor declara que:

- 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 insinuar su copia o violación de cualquier derecho patentario; se revisa esta fuente bibliográfica dada la extensa información de carácter científico-técnico de las que son depositarias: la consulta habitual de la bibliografía de patentes es una práctica muy poco difundida en países en estado de desarrollo, en particular, Argentina.
- En ningún lugar del presente libro se comenta o difunde información propietaria o de carácter reservado: todo lo expuesto se hace en base a bibliografía previamente publicada, tal como se la encuentra referenciada al final de cada tópico.
- Cuando se nombran marcas registradas o productos comerciales, se hacen con objeto de divulgar información técnica; ello no significa una insinuación a su uso con respecto a otras marcas registradas no citadas.

TÓPICO 1

**Actividad del peróxido de hidrógeno
sobre los polisacáridos en general y sobre heparina
en particular; generación de alteraciones estructurales
características**

1.1) Revisión del arte previo: antecedentes bibliográficos del tema

Este documento revisa la existencia de antecedentes bibliográficos de estudios que ilustran la acción del peróxido de hidrógeno sobre los polisacáridos en general, para luego pasar al caso de la heparina en particular. Los trabajos e investigaciones sobre la actividad del peróxido de hidrógeno sobre los carbohidratos datan de la década de 1890, y característicamente y en forma organizada, con los trabajos de H.J.H.Fenton (1). A partir de esa fecha, los desarrollos científicos y técnicos de la reacción del peróxido de hidrógeno sobre los carbohidratos ha sido incesante, dando lugar a interesantes procesos en diversas ramas industriales, como agente blanqueante y oxidante. De hecho, el peróxido de hidrógeno es un blanqueador característico, tanto como el hipoclorito. Esta acción del peróxido de hidrógeno sobre los carbohidratos ha sido revisada exhaustivamente por Moody (2), con exhaustivo detalle. Para los fines de los cuales se ocupa el presente trabajo, los puntos relevantes de la revisión bibliográfica de Moody son:

- La reacción sucede en formas distintas bajo muy extensas condiciones de presión y temperatura, con o sin catalizadores (habitualmente iones metálicos), presencia o ausencia de oxígeno, concentración de sustrato, etc.
- Introducción de microheterogeneidades estructurales en los polisacáridos sustrato, en particular la formación de grupos carboxilo y carbonilo (por ejemplo, caso del almidón de papa).
- La generación de grupos carboxilo y carbonilo se constituyen habitualmente en la aparición de alfa-cetoácidos.
- La depolimerización del polisacárido sustrato (en acuerdo con los puntos anteriores) puede ser seguida por el incremento de la acidez, aumento de la presencia de grupos reductores, caída de la viscosidad, y en algunos casos, de la rotación óptica.
- El reactivo de Fenton es fuente generadora de radicales libres oxigenados, tales como $\text{OH}\cdot$ y $\text{HO}_2\cdot$, y no es enteramente selectivo sobre los enlaces en los que actúa.
- El peróxido de hidrógeno en presencia de sulfato ferroso (Reactivo de Fenton) estimula la depolimerización de la celulosa, en mayor extensión de lo que se depolimeriza con la acción del oxidante citado sin la presencia del catalizador.

Este último punto resulta relevante para el tema que se está tratando pues, aceptado y comprobado que el H_2O_2 actúa sobre la celulosa en forma depolimerizante (y más aún en presencia de ión ferroso), resulta notable que la citada acción sea inhibida o retardada por la presencia de yoduro. El yoduro de potasio inhibe la depolimerización de la celulosa por oxígeno y álcali, con un periodo de inducción prolongado debido a la presencia del citado haluro (3) (4). El presente autor ha comprobado que la acción

inhibitoria del anión yoduro se extiende a gran cantidad de polisacáridos, incluyendo heparina (observaciones no publicadas del autor). Acorde con O. Varela (5), el peróxido de hidrógeno es un oxidante poco efectivo en solventes polares (por ejemplo, agua) a pH neutro o ácido, debido a que la formación del anión hidropéroxido está dificultada. Frente a la elevación del pH, el equilibrio existente a pH neutro resulta desplazado hacia la derecha (5):



Y es por este motivo que el peróxido de hidrógeno se usa en solución alcalina como agente blanqueante, siendo la depolimerización su acción inicial sobre varios polisacáridos, entre ellos, celulosa y pectina (5).

La gran profusión de utilidades técnicas de la clásica reacción de Fenton en algunas de sus aplicaciones particulares, ha sido tenida en cuenta en una publicación reciente del autor (6), lo que hace innecesario repetirlas en este punto. La degradación oxidativa del almidón y de otros polisacáridos a través de mecanismos de radicales libres, fue estudiada por Yagi y sus colaboradores (7) (8), detallando la catálisis positiva que ejercen el ión ferroso, los ácidos ascórbico y d-araboascórbico, la hidroxilamina, e incluso la hidracina, confirmando la aparición de cetoácidos (7); otros catalizadores ensayados fueron el ácido eritrórbico y el ferrocianuro, no sólo sobre almidón, sino sobre amilopectina, carboximetil almidón, CMC, pectina y ácido algínico (8).

También fue estudiado el “adelgazamiento” (pérdida de viscosidad) de suspensiones de almidón a través de la acción del peróxido de hidrógeno, empleando no sólo ión ferroso, sino sales de cromo, cobre y cobalto, en multiplicidad de condiciones experimentales (9), sin excluir la acción de iones manganeso (10). Bessemer y colaboradores (11) efectuaron un descubrimiento muy interesante que permite la oxidación selectiva de parte de los grupos aldehído de un carbohidrato polimérico (generado por ruptura de dioles vía acción del peryodato potásico) a través de la reacción con un halógeno generado “in-situ” por reacción de un haluro con ácido peracético. Acorde con sus descubridores, la oxidación selectiva del grupo aldehído para formar ácidos carboxílicos (en relación 1:1) se efectúa a través del halógeno naciente (reivindicaciones 9 y 10 de la referencia (11)).

La degradación no-enzimática de glucanos provenientes del procesamiento de avena en medio acuoso fue extensamente revisada (12), por aplicación de distintos criterios, que incluyen la degradación oxidativa con oxígeno y con peróxido de hidrógeno en presencia de iones metálicos, en particular hierro, a través de los conocidos procesos Fenton (lo que incluye la interacción del peróxido de hidrógeno con ácido ascórbico para la producción de radicales libres oxigenados fuertemente reactivos y oxidantes).

Se pone el acento en la excelente revisión bibliográfica (12), cuya lectura se propone al profesional estudioso.

La actividad del peróxido de hidrógeno sobre distintos polisacáridos constituye sistemas de reacciones complejos, y es un tema en permanente desarrollo por la multiplicidad de aplicaciones técnicas y posibilidades que presenta. Esto incluye la modulación de estas reacciones desarrollando nuevos reactivos que contienen peróxido de hidrógeno: tal el caso del novedoso complejo de urea-peróxido de hidrógeno, utilizado en la modificación de polisacáridos como oxidante compatible con el medio ambiente (13). El catalizador usado en la oxidación del polisacárido (almidón) fué el tungstato de sodio. La degradación de polisacáridos provenientes de cereales a través de procesos Fenton (peróxido de hidrógeno en presencia de ión ferroso, o utilizando la cupla redox ión ferroso- ácido ascórbico, o la catálisis mediada por cobre (II), manganeso (II), etc.) forma parte del cuerpo de excelentes Tesis (12) (14), en donde se demuestra una vez más, la intervención directa de los radicales hidroxilo y superóxido. La Tesis de Faure (14) pone en relieve varios puntos notables, a saber:

- La sola presencia de ión ferroso o de ácido ascórbico en ausencia de peróxido de hidrógeno, de por sí produce la ruptura molecular de la cadena del polímero, lo cual se explica concluyendo que a temperatura elevada en presencia de ión ferroso, el polisacárido actúa como agente reductor, manteniendo la generación de radicales hidroxilo.
- La degradación sufrida por el beta-glucano modifica su estructura molecular introduciendo nuevos grupos funcionales.
- Estos nuevos grupos funcionales pueden ser aldehídos o cetonas (esto es, carbonílicos) (véase (2)) y carboxilo.
- La velocidad de reacción se incrementa con el aumento de la concentración de ión ferroso y con la temperatura.

Se estimula a la lectura de este importante documento, así como a las publicaciones de la misma autora que forman parte de esta Tesis, en particular (15), sin dejar de destacar que este tipo de reacciones reconoce antecedentes tempranos (16). Hobbs (17) revisa los requisitos necesarios para la optimización del blanqueo industrial con peróxido de hidrógeno de pastas mecánicas de celulosa, en sus aspectos teóricos y prácticos. Las reacciones con ozono también han sido estudiadas para el blanqueo industrial y con fines de depolimerización de polisacáridos. Kishimoto (18) proporciona un destacado estudio sobre el blanqueo de pulpa Kraft con ozono y con reactivo de Fenton, comprobando mecanismos de reacción a la vez que demuestra la aparición de cuerpos carbonílicos y carboxílicos sobre la cadena de celulosa, y Wang et al. (19) describen las reacciones indeseables que la depolimerización con ozono produce: generación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (ácidos fórmico, acético, oxálico), observando que la depolimerización se hace predominante sobre otras reacciones cuando el ozono opera sobre el polisacárido en presencia de buffers básicos.

Duan y Kasper (20) han aportado una notable revisión bibliográfica sobre la depolimerización oxidativa de polisacáridos a través de especies reactivas oxigenadas y nitrogenadas. De esta publicación, se destacan los criterios sobresalientes a los fines de la presente obra, conclusiones que volverán a ser consideradas más adelante, a saber:

- Las especies oxigenadas reactivas pueden depolimerizar polisacáridos: las mismas son radicales libres tales como el hidroxilo, superóxido, peróxido, etc. y habitualmente son generados por especies oxigenadas no radicalarias, tal como el ozono, peróxido de hidrógeno y *ácido hipocloroso*.
- Estas especies reactivas también son generadas por irradiación γ y UV sobre las soluciones acuosas del polisacárido.
- El tratamiento con ozono puede conducir a depolimerizaciones más o menos selectivas, dependiendo de las condiciones de reacción, condiciones que incluyen la conformación de los enlaces glicosídicos. Esto había sido comprobado con anterioridad (19).
- Las reacciones de polisacáridos glicosaminoglicanos sulfato (GAGS) con NaOCl/HClO generan residuos N-clorados (mono y dicloroaminas, clorosulfonamidas) los que a su vez sufren una bien descrita cadena de transformaciones que conducen a la fragmentación del biopolímero por beta-escisión del enlace glicosídico.
- La fragmentación radicalaria del polisacárido vía la producción del radical hidroxilo (por ejemplo, reacción de Fenton) se conduce por beta-escisión del enlace glicosídico a través de bien conocidas y descritas series de reacciones.
- Los tratamientos con ozono conducen a apertura de anillo en uno de los extremos terminales de la cadena, con generación de un grupo carboxilo, lo cual no parece suceder en la fragmentación vía HClO.
- Las reacciones fotoquímicas que sufren los carbohidratos fueron revisadas largo tiempo atrás (21), cuyo aprovechamiento técnico ha permitido novedosos métodos de depolimerización de polisacáridos (22). De la misma manera, la modificación estructural y depolimerización de carbohidratos poliméricos vía irradiación γ de sus soluciones, se encuentra ampliamente detallada (23) (24). La caracterización microestructural de polisacáridos sometidos a la reacción con radical hidroxilo, se puede efectuar elegantemente a través de los métodos de marcado con derivados de aminoacridona (25).

Dado que el autor ha trabajado durante más de 30 años en el campo de los glicosaminoglicanos sulfato, considera que puede resultar de utilidad completar el estado del arte, haciendo una revisión bibliográfica sobre la depolimerización radicalaria de estos carbohidratos complejos, lo cual permite la obtención de valiosos fármacos, tales como las Heparinas de Bajo Peso Molecular (LMWH por sus siglas en inglés), condroitin sulfato de variado peso molecular y/o sus fragmentos respectivos, reconocidos agentes antitrombóticos en el primer caso, y antiartrósicos de variada naturaleza en el segundo.

Varios de estos procesos están basados en la aplicación de la reacción de Fenton o Fenton-relacionadas, y fueron estudiados, desarrollados y practicados a escala técnica, en un meritorio esfuerzo llevado a cabo por la industria químico-farmacéutica, esfuerzos que comenzaron aprox. 40 años atrás y que continuaron denodadamente.

La definición y revisión bibliográfica sobre heparina y polisacáridos relacionados, los métodos generales de depolimerización, las propiedades presentadas por sus oligómeros, etc. están fuera del alcance de esta contribución, y han sido tratados extensamente en forma más que autorizada (26) (27) (28) (29) (30).

Fussi (31) presenta un método de depolimerización de heparina bajo la forma de ácido heparínico, obtenido por tratamiento con una resina de intercambio catiónico en fase ácida, por calefacción en autoclave en presencia de peróxido de hidrógeno/ sulfato ferroso. Pero sucede, como ya se ha visto anteriormente, que el peróxido de hidrógeno presenta actividad oxidante disminuida en medio ácido, y por lo demás, la acidez presente en el medio producía N-desulfatación parcial del polisacárido, lo que obligaba a una engorrosa posterior resulfatación del grupo amino libre; este problema fue rápidamente solucionado (32). Bianchini (33) (34) (35) describe un proceso que utiliza concurrentemente peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico y acetato cúprico, logrando la depolimerización de heparina de grado farmacéutico y obteniendo heparinas de bajo peso molecular (LMWH). Con todo, este proceso requiere prolongados tiempos de reacción y soluciones diluidas de heparina con el consecuente bajo rendimiento. Además, la mezcla de oligosacáridos así obtenidos resultan contaminados con productos de degradación del ácido ascórbico. El proceso resulta mejorado por el mismo investigador, a través de métodos registrados en un relevante documento patentario (36), el cual reivindica la depolimerización de polisacáridos ácidos (y en particular, heparina), utilizando la reacción de descomposición radicalaria del peróxido de hidrógeno en solución acuosa mediada por la presencia de cantidades catalíticas de iones de metales de transición, sean éstos Cu^{++} , Fe^{++} , Cr^{++} (extensión de la reacción de Fenton). También han sido desarrollados otros procesos para la depolimerización de heparina y obtención de las correspondientes LMWH, basados en la reacción del polisacárido en presencia del par $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{++}$ (37).

De la misma forma, la descomposición termolítica del ácido hipocloroso (HClO) también ha sido utilizada para la producción industrial de LMWH y de oligosacáridos de condroitin sulfato (LMWCS) (38): el HClO se descompone termolíticamente generando radicales libres oxigenados, sin necesidad del agregado de catalizadores de ningún tipo, lo que evita la impurificación del oligómero obtenido con trazas de metales u otras sales (39).

Las LMWH obtenidas por degradación vía peróxidos a través de procesos Fenton o relacionados se encuentran definidas en documentos oficiales: Ardeparin (INN) se obtiene por depolimerización de heparina con H_2O_2 a elevada temperatura (40) y Parnaparín (INN) se produce a través de los ya referenciados métodos de reacción con H_2O_2 y acetato cúprico (41), y también con hipoclorito (42). Los procesos foto-

químicos también han sido utilizados para la degradación de heparina y polisacáridos relacionados. La degradación fotolítica de heparina utilizando como catalizador dióxido de titanio, fué estudiada tempranamente por Blazková et al (43): la irradiación de polisacáridos en solución acuosa, de por sí produce cadenas radicalarias que permiten depolimerizar eficientemente glicosaminoglicano sulfatos (44) (45). Higashi y colaboradores (46) obtienen LMWH a través de la fotólisis de heparina vía UV/TiO₂, efectuando una excelente elucidación estructural de los oligómeros obtenidos en comparación con LMWH comerciales, obtenidas por distintos métodos; dado que la irradiación UV de TiO₂ produce H₂O₂ que rápidamente se escinde con formación de O₂⁻ y OH• (hecho ya previamente confirmado y estudiado por Harbour et al. (47)), la depolimerización de heparina en estas condiciones se demuestra como francamente radicalaria. En principio, la reacción parece ser más suave y respetuosa de la estructura molecular del polisacárido si se lo compara con procesos Fenton “convencionales”: aún así, pequeños fragmentos deben ser eliminados por diafiltración (46). La depolimerización fotoquímica también ha sido aplicada con provecho a la obtención de oligosacáridos de dermatán sulfato (48). La depolimerización radicalaria del ácido hialurónico (glicosaminoglicano no sulfatado) efectuada por vía Fenton, fue estudiada en forma notable por Uchiyama et al. (49) (por burbujeo de una corriente de O₂ en presencia de iones ferrosos), y revisado por Stern et al. (50). De esta misma revisión, debería poder observarse que en el curso de las reacciones óxido-reductivas (ORD, oxidative reductive depolymerization)) (de las cuales la reacción de Fenton es el ejemplo característico), se introducen en los oligosacáridos resultantes, alteraciones microestructurales, vale decir, microheterogeneidades en la cadena del oligómero, que por cierto, han demostrado ser características del tipo de reacción empleada *y de las condiciones en las que se lleva a cabo dicha reacción depolimerizante*.

En este punto, parece interesante efectuar una discreta revisión del arte previo que abarque estos conceptos, en los oligosacáridos en general y en LMWH en particular.

1.2) LMWH y oligosacáridos relacionados obtenidos por métodos de fragmentación radicalaria: patrones estructurales característicos

En sus tempranos estudios sobre la depolimerización del hialuronato catalizada por iones ferrosos, Kennedy y Cho Tun (51) reportan la aparición de ácido urónico 4-5 insaturado en los oligómeros obtenidos. Posteriormente se demuestra que los fragmentos ORD del hialuronato contienen 21% y 24% de hexosamina y de ácido urónico respectivamente, respecto del polisacárido inicial, permaneciendo constante el tenor

de acetilo (49). En un estudio posterior, Nagasawa y colaboradores (52) depolimerizan heparina en solución acuosa conteniendo iones ferrosos por burbujeo de una corriente de oxígeno. Se obtienen interesantes conclusiones, a saber:

- La proporción de restos de L-idurónico 2-O sulfato permanece sin cambio, lo que hace suponer cierta indiferencia de estos grupos a la reacción llevada a cabo en las citadas condiciones.
- Se registra una marcada pérdida de ácidos urónicos no sulfatados (D-glucurónico), por lo que, dada su susceptibilidad al ataque radicalario, parece ser un punto de corte en la cadena del polisacárido inicial.
- Lo registrado está de acuerdo con Bianchini et al. (53), quien demuestra que el sistema ácido ascórbico- H_2O_2 - Cu^{++} oxida preferencialmente las regiones menos sulfatadas (y también las de menor peso molecular, acorde a la experiencia del presente autor).
- La existencia de ácido glucurónico en el extremo terminal reductor de la LMWH obtenida, cuando está vinculado a glucosamina 2-sulfato o glucosamina 2-6 disulfato parece demostrar que esta agrupación es resistente al ataque en estas condiciones, no así cuando el glucurónico está unido a la acetil glucosamina o acetil glucosamina 6-sulfato.
- Aparición de ácido urónico 4-5 insaturado en el extremo no reductor del oligosacárido (aprox. en un tenor del 2,4%). Este grupo de investigación es el primero en demostrar la formación de enlaces olefinicos sobre grupos urónico de LMWH así obtenida, lo que indica la existencia de un proceso (aunque minoritario) de beta-eliminación, con pérdida del H_β de la unidad de ácido urónico (52).

Por lo demás, en el curso de la depolimerización de heparina realizada por vía fotolítica- TiO_2 , se han registrado cambios en el espectro UV del polímero (43) (fragmentación de tipo radicalario, por lo menos, en alguna de sus etapas). En el año 1990, Linhardt y colaboradores (54) comprobaron la existencia de una “región marcadora” en LMWH obtenidas por clivaje oxidativo, y presente por tanto, en LMWH producidas por fragmentación radicalaria, estableciéndose la ruptura en el diol vecinal libre, situado sobre los restos de ácido idurónico y glucurónico no sulfatados: Esta microheterogeneidad, ausente en la heparina original, estaba formando parte hasta en el 18% de las cadenas, cantidad algo menor que la previsible dada la estructura de la heparina original. Aunque en (54) no se hace mención a la aparición de dobles enlaces, los mecanismos intervinientes en este fenómeno ya habían sido reportados tempranamente (55) (56) y adecuadamente referenciados en (52). En general, todos los métodos de depolimerización radicalaria (incluso aquellos que utilizan radiación γ) (57), reposan en la generación de radicales libres oxigenados que oxidan restos sacarídicos sensibles dentro de la cadena del polisacárido, siendo los más susceptibles aquellos que están no sustituidos en posición 2-3 del anillo sacarídico: los ácidos urónicos no sulfatados son

los grupos oxidados “selectivamente”, tal como se describió; incluso se ha registrado la generación de ácidos orgánicos pequeños (19) y de fragmentos menores que resultan dializables (46).

En lo relativo a la generación de doble enlace en oligosacáridos resultantes de la degradación radicalaria de otros carbohidratos poliméricos distintos de los glicosaminoglicanos, el presente autor no ha encontrado referencias relevantes al respecto, pero desea hacer notar lo siguiente: formando parte de su notable Tesis Doctoral, Faure (14) incluye un documento de estudio de la degradación de beta-glucanos por vías alternativas (15). En tal documento, Faure adjunta fotografías del aspecto que presentan los productos de degradación radicalaria y térmica del beta-glucano original: se observa que el producto de reacción radicalaria está fuertemente coloreado de un tono marrón (tal es el aspecto de los productos “crudos” de reacción vía procesos Fenton). Sorprendentemente, la autora no registra el espectrograma UV-Vis de esta sustancia, pero es evidente que, en una estructura molecular orgánica, *“la presencia de color se debe atribuir a la posibilidad de fenómenos de resonancia”* (58). Más aún, continuando con la cita de Glasstone (58), *“cuando la absorción tiene lugar únicamente en el ultravioleta, la sustancia será incolora; pero si en la molécula se verifican cambios estructurales que provoquen un desplazamiento hacia longitudes de onda más largas, puede resultar la aparición de un color visible”*. Esto sugiere que el producto fotografiado en (15) debería presentar absorción UV, ya sea por efecto de condensaciones, dobles enlaces conjugados, etc. Si esto es así, el hallazgo es consistente con lo ya descrito en el campo de los glicosaminoglicanos, formando parte de un mecanismo más general.

Con respecto a los mecanismos de reacción que producen la fragmentación radicalaria de glicosaminoglicanos, se ha producido una abrumadora cantidad de información, a partir del año 1990 en adelante. El autor puntualizará los aspectos fundamentales de la bibliografía que, a su criterio, resulta relevante y sumamente autorizada: por tanto, la literatura referenciada es parcial y dista mucho de ser abarcativa del tema. El uso de técnicas instrumentales, tales como las distintas clases de espectroscopía y sus modalidades (IR, RMN, RSE, MS, etc.) han permitido notables contribuciones al conocimiento de mecanismos de reacción, detección de radicales libres durante el curso de la fragmentación y el esclarecimiento de patrones estructurales característicos establecidos sobre la molécula del oligosacárido resultante, lo que constituye una suerte de “huella digital” marcadora del tipo de proceso de depolimerización, así como de las distintas variantes de las condiciones en las que se conduce dicho proceso. Esto es importante no sólo desde el punto de vista científico, sino técnico, en tanto que permite la verificación de desviaciones de las condiciones óptimas del proceso depolimerizante, con la seguridad de obtención del mismo producto, lote a lote. En este sentido, la caracterización espectroscópica de grupos terminales en LMWH y los diferentes artefactos producidos por tratamientos químicos indebidos (por ejemplo, álcalis), se encuentran bien documentados:

- Esta caracterización incluye los patrones de sulfatación, grupos terminales, gene-

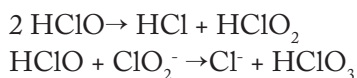
ración de iduronilepóxidos y derivados aziridínicos de la glucosamina N-sulfato (59) (60)

- Quizá con excepción de las heparinas de muy bajo peso molecular (VLMWH), estas modificaciones estructurales menores sobre la cadena del oligosacárido, pueden ser más importantes que los diferentes grupos terminales formados por distintos métodos de depolimerización (59).
- Está bien establecido que el nivel de fragmentación es diferente acorde se cambien las condiciones de reacción, así como el nivel de reproducibilidad estructural en las respectivas LMWH obtenidas (61).
- Se confirmó la desaparición de ácido urónico no sulfatado (ya reportado en (52)), cuando esta unidad se halla seguida de glucosamina $\text{NSO}_3\text{6OH}$, así como también el decremento en el tenor de ácido glucurónico cuando está seguido de N-acetilglucosamina; también se ha confirmado la ruptura $\text{C}_2\text{-C}_3$ en glucosamina y ácidos urónicos, *con formación de nuevos grupos -CO-R*. (62).
- En LMWH obtenidas vía procesos Fenton (Cu^{++} , Fe^{++}), el pentasacárido de afinidad a Antitrombina III se encuentra grandemente preservado. El Fe^{++} actúa como catalizador, mientras que el Cu^{++} actúa como un reactivo. LMWH obtenidas vía Cu^{++} son inestables en medio básico, pero el proceso resulta mucho más reproducible que con el uso de Fe^{++} ; las características estructurales de esta LMWH son peculiares, y en lo referente al mecanismo de reacción, se confirma como ruta principal el clivaje del enlace glicosídico sobre el urónico no sulfatado unido a glucosamina $\text{NSO}_3\text{6OH}$ (63), ya reportado en (62): en el proceso de reacción con Cu^{++} y H_2O_2 , se detectó la presencia de un radical nitróxido estable, probablemente generado por el ataque de $\text{OH}^\bullet$ sobre la glucosamina N-sulfato o sobre aminogrupos libres presentes en la heparina original (64).
- Las correlaciones estructura- actividad biológica (SAR), en particular la dependencia de la bioactividad en función de patrones estructurales particulares, se ha constituido en un desafío mayor en el diseño de versiones genéricas de LMWH propietarias (65).
- LMWH obtenidas por irradiación y parecen poseer una estructura molecular más homogénea y preservada con relación a la heparina original (66).
- La variabilidad de la estructura molecular de LMWH obtenida por el mismo proceso es muy limitada, y la mayoría de esta variabilidad se deriva de la heparina de partida. La vinculación de la estructura molecular de la heparina inicial (en sus distintos bloques constituyentes) con artefactos producidos en la LMWH obtenida, esto es: formación de epóxidos y posterior epimerización del residuo idurónico 2 sulfato para rendir ácido galacturónico, así como la generación de aziridinas sobre la glucosamina N-sulfato, se encuentran perfectamente detalladas; la importancia de la detección de los anómalos grupos de ácido galacturónico unido a glucosamina $\text{NSO}_3\text{6OSO}_3$, generados por tratamientos alcalinos efectuados sobre

el polisacárido “madre” conducidos en condiciones sub-óptimas (67) ha resultado en un sustancial incremento de la investigación y mejora de los procesos de producción de heparina de grado farmacéutico para usos de depolimerización, dando lugar a métodos propietarios (68).

- Los procesos Fenton se han utilizado también para la obtención de oligosacáridos de condroitin sulfato (CS) y dermatán sulfato (DS). Aplicado un proceso Fenton H_2O_2 - Cu^{++} sobre DS permite la obtención de LMWDS que conserva mayoritariamente la estructura del DS original, conteniendo N-acetilgalactosamina 4-sulfato como grupo terminal reductor. Sin embargo, como “huella digital” del proceso, se detecta la presencia de ácido N-acetilgalactosamínico 4-sulfato en lugar del grupo reductor antes citado, lo cual representa una estructura no presente en el polisacárido inicial (69).
- La depolimerización de CS fucosilado de origen marino vía Fenton genera apertura del anillo del resto de ácido glucurónico como microheterogeneidad característica del proceso (70).

Con referencia a la actividad que el ácido hipocloroso y hipoclorito presentan sobre los polisacáridos, incluyendo su depolimerización, se puede establecer lo siguiente: en el año 1952, Lister (71) obtuvo que el ácido hipocloroso se descompone de acuerdo a:

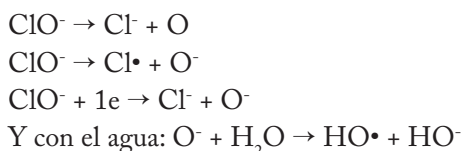


Verificándose también que: $\text{HClO} + \text{ClO}^- \rightarrow \text{ClO}_2^- + \text{HCl}$

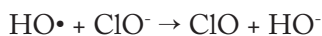
lo que contribuye, aunque poco, a la descomposición final del HClO.

Lister determinó que la reacción generante de O_2 es de I orden y puede ser la clásica:

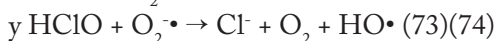
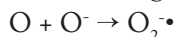
$\text{HClO} \rightarrow \text{HCl} + \text{O}$ admitiendo que “*hay una segunda etapa que lleva del O atómico a la generación de una molécula de O_2* ” (71). Se debe poner en relieve que el HClO no es la única especie oxidante presente, sino que en el seno de la reacción existen clorito y clorato (ClO_2^- y ClO_3^-) fuertemente oxidantes, como así también otros radicales oxigenados. En efecto: con el concurso de la luz o del calor, en soluciones acuosas neutras (y aún alcalinas), se ha comprobado que existen las siguientes reacciones (72):



Lo que explica la aparición y consecuente reacción del muy reactivo y oxidante radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$. Una reacción de terminación de la cadena radicalaria es:



Habiéndose generado O , $\text{O}\cdot$ y O^- :



en todo similar a la reacción de Haber- Weiss:



Con lo cual la depolimerización de la heparina vía HClO parece (por lo menos en parte) mediada por el oxidante y reactivo $\text{HO}\cdot$ tal como en los procesos que utilizan H_2O_2 . Por tanto, es esperable la aparición de alteraciones similares en la cadena del oligómero obtenido, en particular como las ya detalladas, lo que explica algunos resultados ya publicados (75). Como sucede con el ataque del $\text{HO}\cdot$ generado en la descomposición Fenton del H_2O_2 , parece que la reacción (tal como fue determinada para el ácido hialurónico y el CS) se localiza sobre el residuo N-acetilaminoazúcar generando la fragmentación del polisacárido (76). En particular, la reacción del HClO sobre los glicosaminoglicanosulfatos (GAGS) rinden cloramidas derivadas del ataque sobre el grupo N-acetilo, con generación de radicales amidilo, los cuales, a su vez, sufren rápida abstracción intramolecular para dar radicales libres carbocentrados en C_2 de la glucosamina y en C_4 del urónico vecino, lo cual conduce a la degradación del polisacárido (77).

En el caso del CS, el ataque efectuado por radicales libres oxigenados parece ser más selectivo que para el HA: un radical generado sobre el C_5 del ácido glucurónico, que es estable en altas concentraciones, sufre reordenamientos en medio ácido y también alcalino, lo que resulta en la ruptura de la cadena polisacáridica generando los oligosacáridos correspondientes (78). Resulta interesante destacar que, una vez más, se reporta que los polisacáridos son más resistentes a la fragmentación radicalaria cuanto más sulfatados son, de manera que el más lábil es el HA y el más resistente, la heparina (79), reconfirmando lo ya observado (52) (53). El CS expuesto, también sufre cierto grado de desulfatación aunque marginal (79) (y lo mismo puede observarse en heparina frente al ataque de radicales oxigenados). En el caso de la actividad que presenta el HClO sobre el heparán sulfato (HS, carbohidrato heparinosimilar, con un grado de sulfatación intermedio entre el CS/DS y Heparina), se generan los ya citados N-cloroderivados (mono y dicloroaminas, N-clorosulfonamidas y cloramidas), los cuales se descomponen a su vez iniciando la fragmentación del polisacárido: los mecanismos de reordenamiento, generación de radicales carbonados y lugares de ruptura se encuentran bien detallados (80) (81).

Los esfuerzos para lograr una caracterización cada vez más exhaustiva de heparina destinada a usos farmacéuticos (y a ser utilizada como materia prima química de depolimerización) se han multiplicado durante las dos últimas décadas, logrando aportar una colección sumamente abundante de información detallada al respecto, a la cual se remite al lector interesado, ya que su discusión trasciende el objeto de esta discreta obra (82) (83) (84); al respecto se debe destacar la notable solicitud de patente generada por investigadores de la más que prestigiosa Momenta Pharmaceutical Inc. (EEUU) (85); se ha publicado recientemente una destacada revisión bibliográfica sobre las aplicaciones de la espectrometría de masas a la elucidación estructural de LMWH obtenidas por distintos métodos (86). A lo largo de la presente revisión bibliográfica histórica, debe haberse notado que en la caracterización estructural de un polisacárido (no necesariamente GAGS) se utiliza instrumental analítico cuyo montaje raramente se encuentra en una instalación químico-farmacéutica ubicada en países en vías de desarrollo o directamente subdesarrollados. En ese caso, parece interesante disponer de un test técnico que permita una aproximación experimental para establecer si, efectuada una depolimerización Fenton o Fenton-relacionada, el oligosacárido obtenido se comporta idénticamente de lote a lote, en forma rápida y como control de proceso, antes de comenzar tareas de purificación, que podrían hacer desaparecer artefactos estructurales como los ya mencionados. Esto no debe entenderse como un menosprecio de las relevantes técnicas instrumentales referenciadas, sino como un conocimiento técnico, se diría fabril, obtenido rápidamente sobre el oligómero “crudo” de reacción. El autor hace notar que este criterio no debe ser interpretado como circunscripto al área de los GAGS de bajo peso molecular, sino a la fabricación de cualquier oligosacárido. El ensayo puede consistir en seleccionar dos propiedades químicas y/o físicas del oligosacárido en particular, que puedan relacionarse una con la otra, de manera que cualquier variación de una de ellas, será advertida rápidamente, denotando una anormalidad en el curso del proceso (o en el polisacárido materia prima).

Un ejemplo puede clarificar el concepto: durante la depolimerización Fenton de un polisacárido se producen, sin lugar a dudas, grupos carbonílicos y carboxílicos en el oligosacárido final obtenido (2) (7) (12) (14) (18) (62); por lo demás, la formación de α -cetoácidos, también está bien conocida y establecida (2) (7). Por otra parte, la generación de una cierta tasa de insaturación sobre el oligómero resultante, también se encuentra bien documentada (51) (52) (55) (56), e inductivamente por (14) (15), como ya se ha discutido anteriormente. La aparición de dobles enlaces desarrolla una absorbancia UV, fácilmente mensurable por un espectrofotómetro adecuado, al alcance de casi cualquier laboratorio industrial, mientras que la presencia de grupos carbonílicos en general, y de α -cetoácidos en particular, puede ser evaluada a través de colorimetrías, o de reacciones a la gota fácilmente convertibles en un método colorimétrico. Para el caso de α -cetoácidos (87) pueden ser útiles ensayos de color ya reportados en el año 1949, acorde a referencias allí citadas; de manera que lo que aquí se plantea es

conocido desde hace varias décadas. Sin embargo, puede ser de utilidad. Ahora bien, si los valores obtenidos de la cuantificación de grupos α -cetoácidos y las medidas de absorbancia UV se disponen sobre un sistema de coordenadas, provisto de dos ejes de ordenadas (tal como se procede a resolver un sistema de dos ecuaciones lineales con dos incógnitas a través del método gráfico), su unión resultará en una línea recta. Este tendido lineal variará dentro de ciertos límites permisibles fijados por el especialista en base a exhaustivos trabajos de laboratorio, basados en la preparación de oligosacáridos a partir de un mismo lote y de distintos lotes del polisacárido materia prima de reacción, evaluando los oligómeros resultantes tal como se indicó: toda desviación fuera de esos rangos significará una anomalía en la producción o en el polisacárido utilizado como materia prima química. El experto formado en el arte percibirá claramente las distintas y variadas formas de aplicación de este criterio, antes de pasar al examen instrumental más complejo, más caro y menos accesible en los países periféricos.

1.3) Referencias bibliográficas

- 1) **Fenton**, H.J.H. (1876), On a new reaction of tartaric acid; Chemical News 33:190
- 2) **Moody**, G.J. (1964); The action of hydrogen peroxide on carbohydrates and related compounds; Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 19:149-179
- 3) **Minor**, J.L.; Sanyer, N. (1971); Oxygen/alkali oxidation of cellulose and model alcohols and the inhibition by iodide; J. Pol. Sci. Part C: Polymer Symposia 36 (1): 73-84.- doi:10.1002/polc.5070360107
- 4) **Minor**, J.L.; Sanyer, N. (1974); Carbohydrate stabilization with iodide in oxygen bleaching of kraft pulps; Tappi 57(2): 109-112
- 5) **Varela**, O. (2003); Oxidation reactions and degradation of sugars and polysaccharides; Adv. Carbohyd. Chem. Biochem. 58: 307-369
- 6) **Díaz**, V.B. (2018), Oligosacarinas (Oligosacáridos); Producción química y aplicación a los cultivos vegetales (Ed. Autores de Argentina, Bs.As.; ISBN: 978-987-761-465-7): 67-124; www.victorbautistadiatzquimico.com
- 7) **Yagi**, K.; Suzuki, H. (1965); Oxidative degradation of starch by free radical systems; Agric. Biol. Chem. 29(5): 447-455.- doi:10.1080/000221369.1965.10858410
- 8) **Yagi**, K. (1969); Oxidative degradation of starch by free radical systems. Part II: degradation of starch and other polysaccharides in solution; J. Jap. Soc. Starch Sci. 17(1): 183-189.- https://www.jstage.jst.go.jp/article/jag1953/17/1/17_1_183/_pdf
- 9) **Lotz-gessell**, J.A.; Moser, K.B.; Hurst, T.L. (1976); Method of peroxide thinning granular starch; US Patent 3975206

- 10) **Kruger**, L.H. (1989); Degradation of granular starch; US Patent 4838944
- 11) **Bessemer**, A.C.; Jetten, J.M.; Van Doren, H.A.; Van der Lugt, L.P. (1998); Carbohydrate oxidation products; Eur. Pat. Appl. 0999222 A1
- 12) **Kivelá**, R. (2011); Non-enzimatic degradation of (1→3)(1→4)-β-D-glucan in aqueous processing of oats; Academic Dissertation (Univ. Helsinki).- <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/27303/nonenzym.pdf.sequence=1>
- 13) **Lukasiewicz**, M. (2012); Solid complex of hydrogen peroxide as a safe and green oxidant for polysaccharide depolymerization; VI Int. Electronic Conference on Synth. Org.Chem. (ECSOC-16) . www.usc.es/congresos/ecsoc/16/hall_d_PSC/d003/index.pdf
- 14) **Faure**, A.M. (2013), Hydroxyl radical mediated degradation of cereal beta-glucan; Doctoral Thesis (ETH, ZURICH; Diss. ETH 21164).- doi: 10.3929/ethz-a-009785350
- 15) **Faure**, A.M.; Sánchez-Ferrer, A.; Zabara, A.; Andersen, M.L.; Nystrom, L. (no date); "Modulating the structural properties of β-glucan degradation products by alternative reaction pathways" in Faure, A.M. (2013); opus cit.: 147-173
- 16) **Uchida**, K.; Kawakishi, S. (1986); Oxidative depolymerization of polysaccharides induced by the ascorbic acid-copper ions systems; Agric. Biol. Chem. 50(10): 2579-2583.- doi: 10.1080/00021369.1986.10867785
- 17) **Hobbs**, G.C. (1994); The role of radical species in peroxide bleaching process; Ph.D. Thesis (Univ. Tasmania).- <https://core.ac.uk/download/pdf/33331410.pdf>
- 18) **Kishimoto**, T. (1996); Studies on the polysaccharide reactions in ozone bleaching of Kraft pulp; Dissertation (Kioto Univ.).- doi: 10.11501/3120282
- 19) **Wang**, Y.; Hollingsworth, R.I.; Kasper, D.L. (1999); Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution; Carbohydr. Res. 319 (1-4):141-147
- 20) **Duan**, J.; Kasper, D.L. (2011); Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species; Glycobiology 21(4): 401-409; doi. 10.1093/glycob/cwq171
- 21) **Binkley**, R.W. (1981); Photochemical reactions of carbohydrates, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 38: 105-193
- 22) **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
- 23) **Ciesla**, K.A. (2017); "Radiation modification of polysaccharides and their composites/ nanocomposites" in "Application of ionizing radiation in materials processing" (Sun, Y. ed.; Inst. Nucl. Chem. and Technol.; ISBN 8394641202); vol. 2: 327-354
- 24) **The Radiation Chemistry of Polysaccharides (2016); (Al-Assaf**, S.; Coqueret, X.; Dahlan, K.Z.H.M.; Sen, M.; Ulanski, P. eds.; Int. Atomic Energy Agency, Vienna; ISBN 978-92-0-101516-7); 467 pages
- 25) **Vreeburg**, R.A.M.; Airianah, O.B.; Fry, S.C. (2014); Fingerprint of hydroxyl ra-

- dical-attacked polysaccharides by N-isopropyl-2-aminoacridone labeling; *Biochem. J.* 463: 225-237.- doi: 10.1042/BJ 20140678
- 26) **Lane, D.A.**; Lindhal, U. eds. (1989); *Heparin; Chemical and Biological Properties and Clinical Applications*; (Edward Arnold Pub.; ISBN 0-7131-4533-1)
 - 27) **Lane, D.A.** et al. Eds. (1992); *Heparin and Related Polysaccharides* (Plenum Press)
 - 28) **Ogura, H.**; Hasegawa, A.; Suami, T. (eds.) (1992); *Carbohydrates- Synthetic methods and applications in medicinal chemistry* (Kodansha, Tokio; VCH)
 - 29) **Linhardt, R.J.**; Gunay, N.S. (1999); Production and chemical processing of low molecular weight heparins; *Sem. Thromb. Hemost.* 25(3): 5-15
 - 30) **Guangli, Y.**; Huashi, G.; Jiamin, X.; Qub, W.; Linhardt, R.J. (2001); Preparation and structure-activity differences of low molecular weight heparins (LMWH); *J. Ocean Univ. Qingdao* 31(5): 673-680.- www.heparin.rpi.edu/main/files/papers/258.PDF
 - 31) **Fussi, F.** (1981), Process for obtaining low molecular weight heparins endowed with elevated pharmacological properties, and products so obtained; US Patent 4281108
 - 32) **Fussi, F.**; Fedeli, G. (1982); UK Patent GB 2002406 B
 - 33) **Bianchini, P.** (1984); Process for the preparation of oligosaccharide fractions having pharmacological properties by chemical degradation of heparin; Eur. Pat. Appl. 0121067 A1
 - 34) **Bianchini, P.** (1986); Process for the preparation of oligosaccharide fractions by degradation of heparin; US Patent 4629699
 - 35) **Mascellani, G.**; Bianchini, P. (1995); Oligosaccharides having antiatherosclerotic activity; Eur. Patent 0439555 B1
 - 36) **Mascellani, G.**; Bianchini, P. (1986); Depolymerized glycosaminoglycan sulfates endowed with an antithrombotic, fibrinolytic, antiinflammatory activity, their process of preparation and related pharmaceutical compositions; Int. Pat. Appl. (PCT) WO 86/06729 A1 (also published as EP 0221977 B1; US Pat. 4973580)
 - 37) **Díaz, V.B.**; Dománico, R.H.; Fussi, F. (1993); Procedimiento químico para la depolimerización controlada de polianiones naturales y productos así obtenidos, excluidos sus usos farmacéuticos; Pat. Argentina 243540 (también publicado como Patente Española 2007373; Patente Italiana 1224260; Patente Belga 8700861)
 - 38) **Díaz, V.B.**; Dománico, R.H.; Fussi, F. (1990); Process for controlled depolymerization of polysaccharides; US Patent 4977250 (also published as EP 268885 B1)
 - 39) **Linhardt, R.J.** (1992); "Chemical and enzymatic methods for the depolymerization and modification of heparin" in "Carbohydrates- Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry" (opus cit.): 385- 401
 - 40) **International non-proprietary names for pharmaceutical substances (1993); WHO Drug Information** 7(3): 135

- 41) **International non-proprietary names for pharmaceutical substances (1991); WHO Drug Information 5 (3): 139**
- 42) **Parnaparin Sodium**, JP XVI Ed. Suppl. 1: 2462 .- stg3plus.bpfk.gov.my/frontend/aHachment/624/pharma/170408_20160811_143700_.pdf
- 43) **Blazková, A.**; Brezova, V.; Soldanova, Z.; Stasko, A. and others (1995); Photocatalytic degradation of heparin over titanium dioxide; *J. Mat. Sci.* 30: 729-733
- 44) **Shibata, Y.** (2004); Method for producing low molecular weight glycosaminoglycan by ultraviolet ray irradiation; US Patent Appl. 2004/0167243 A1
- 45) **De Ambrosi, L.**; Bensi, D.; Vismara, E. (2009); Process for the physical depolymerization of glycosaminoglycans and products obtained therefrom; US Patent 7605242 B2
- 46) **Higashi, K.**; Hosoyama, S.; Ohno, A.; Masuko, S. and others (2012); Photochemical preparation of a novel low molecular weight heparin; *Carbohydr. Polym.* 67(2): 1737- 1743.- doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.087
- 47) **Harbor, J.R.**; Tromp, J.; Hair, M.L. (1985); Photogeneration of hydrogen peroxide in aqueous TiO₂ dispersions; *Can. J. Chem.* 63: 204-208
- 48) **Panagos, C.G.**; August, D.P.; Jesson, C.; Uhrin, D. (2016); Photochemical depolymerization of dermatan sulfate and analysis of the generated oligosaccharides; *Carbohydr. Pol.* 140: 13-19 .- doi: 10.1016/j.carbpol.2015.11.078
- 49) **Uchiyama, H.**; Dobashi, Y.; Ohkuchi, K.; Nagasawa, K. (1990); Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid; *JBC* 265 (14): 7753-7759
- 50) **Stern, R.**; Kogan, G.; Jedrzejewski, M.J.; Soltés, L. (2007); The many ways to cleave hyaluronan; *Biotechnol. Advances* 25: 537-557.- doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.001
- 51) **Kennedy, J.F.**; ChoTun, H. (1972); The degradation of hyaluronic acid by ferrous ions; *Carbohydr. Res.* 22: 43-51
- 52) **Nagasawa, K.**; Uchiyama; H.; Sato.; Hatano, A. (1992); Chemical change involved in the oxidative-reductive depolymerization of heparin; *Carbohydr. Res.* 236: 165-180
- 53) **Bianchini, P.**; Osima, B.; Parma, B.; Dietrich, C.P. and others (1985); Structural studies and “in vivo” pharmacological activities of heparin fractions and fragments prepared by chemical and enzymic depolymerization; *Thromb. Res.* 40(1): 49-58.- doi:10.1016/0049-3848(85)90349-4
- 54) **Linhardt, R.J.**; Loganathan, D.; Al-Hakim, A.; Wang, H-M. and others (1990); Oligosaccharide mapping of low molecular weight heparins: structure and activity differences; *J. Med. Chem.* 33: 1639-1645
- 55) **Sundblad, L.**; Balazs, E.A. (1966); *The Amino Sugars* (Balazs. E.A.; Jeanloz, R.W. eds.; Academic Press, New York, II Ed.); II B: 229-250
- 56) **Herp, A.** (1980); *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry* (Pigman, W.;

- Horton, D. eds.; Acad. Press, N.Y.; II Ed.) I B: 1276-1297
- 57) **De Ambrosi, L.**; Recchia, W.; Ferrari, G. (1991); Process for the controlled preparation of low molecular weight glycosaminoglycans; US Patent 4987222
 - 58) **Glasstone, S.**(1957), Tratado de Química Física (Aguilar, Madrid): 473-564 (en particular, pags. 526-530)
 - 59) **Casu, B.**; Torri, G. (1999); Structural characterization of low molecular weight heparins; *Semin. Thromb. Hemost.* 25(3): 17-25
 - 60) **Viskov, Ch.**; Mourier, P. (2009); Method for determining specific group constituting heparins or low molecular weight heparins; US Pat. Appl. 2009 0023171
 - 61) **Rota, C.**; Liverani, L.; Spelta, F.; Mascellani, G. and others (2005); Free radical generation during chemical depolymerization of heparin; *Anal. Biochem.* 344(2): 193-203.- doi: 10.1016/j.ab.2005.06.043
 - 62) **Vismara, E.**; Pierini, M.; Guglieri, S.; Liverani, L. and others (2007); Structural modification induced in heparin by a Fenton-type depolymerization process; *Semin. Thromb. Hemost.* 33(5): 466-477
 - 63) **Vismara, E.**; Pierini, M.; Mascellani, G.; Liverani, L. and others (2010); Low molecular weight heparin from Cu²⁺ and Fe²⁺ Fenton- type depolymerization process, *Thromb. Hemost.* 103: 613-622
 - 64) **Rota, C.**; Liverani, L.; Iannone, A.; Spelta, F. (2006); Detection of a stable nitroxide during chemical depolymerization of heparin; *Res. Chemical Intermediates* 32(1): 73-81.- doi: 10.1163/156856706775012932
 - 65) **Guerrini, M.**; Guglieri, S.; Naggi, A.; Sasisekharan, R.; Torri, G. (2007); Low molecular weight heparins: structural differentiation by bidimensional magnetic resonance spectroscopy; *Semin. Thromb. Hemost.* 33(5): 478-487.- doi: 10.1055/s-2007-982078
 - 66) **Bisio, A.**; De Ambrosi, L.; Gonella, S.; Guerrini, M. and others (2001); Preserving the original heparin structure of a novel low molecular weight heparin by γ - irradiation; *Arzneimittel- Forschung (Drug Research)* 51 (19): 806-813.- doi: 10.1055/s-0031-1300159
 - 67) **Bianchini, P.**; Liverani, L.; Spelta, F.; Mascellani, G. and others (2007); Variability of heparins and heterogeneity of low molecular weight heparins; *Semin. Thromb. Hemost.* 33: 496-502.- doi: 10.1055/s-2007-982080
 - 68) **Bianchini, P.**; Mascellani, G. (2007); Process for preparing high purity low molecular weight heparins; *Europ. Patent EP 1510528 B1*
 - 69) **Panagos, C.**; Thomson, D.; Bavington, Ch.; Uhrin, D. (2012); Structural characterization of oligosaccharides obtained by Fenton-type radical depolymerization of dermatan sulfate; *Carbohydr. Polymers* 87(3): 2086-2092.- doi: 10.1016/j.carbpol.2011.10.031
 - 70) **Li, J-H.**; Li, S.; Yan, L-F, Ye, X-Q. and others (2016); Depolymerization of fucosylated chondroitin sulfate with a modified Fenton system and anticoagu-

- lant activity of the resulting fragments; *Marine Drugs* 14: 170.- doi: 10.1039/md4090170
- 71) **Lister**, M.W. (1952); The decomposition of hypochlorous acid; *Can. J. Chem.* 30(11): 879-889.- doi: 10.1139/v52-107
 - 72) **Buxton**, G.V., Suhbani, M.S. (1972); Radiation chemistry and photochemistry of oxichlorine ions. Part 2:- Photodecomposition of aqueous solutions of hypochlorite ions; *J. Chem. Soc. Faraday Transactions* 1; 68: 958-969.- doi: 10.1039/F19726800958
 - 73) **Candeias**, L.P.; Patel, K.B.; Strattford, M.R.; Wardman, P. (1993); *FEBS Letter* 25: 151-153
 - 74) **Aydin**, S. (2005); Antioxidant status, α -amilase production, growth and survival of hemoglobin bearing *Escherichia coli* exposed to hypochlorous acid ; *Biochemistry (Moscow)* 70 (12): 1369-1376
 - 75) **Fuentes**, E.P., Díaz, V.B. (1996); Caracterización mediante mapeo oligosacárido de heparina de bajo peso molecular obtenida por fragmentación radicalaria; *Acta Farmacéutica Bonaerense* 15(4): 209-214
 - 76) **Hawkins**, C.L.; Davies, M.J. (1998); Degradation of hyaluronic acid, poly and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: evidence for radical intermediates and fragmentation; *Free Rad. Biol. Med.* 24(9): 1396-1410.- doi: 10.1016/S0891-5849(98)00009-4
 - 77) **Rees**, M.D.; Hawkins, C.L.; Davies, M.J. (2003); Hypochlorite mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates and related N-acetyl glycosamines: evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions and site-specific fragmentation; *JACS* 125(45): 13719-13733.- doi:10.1021/ja0370591
 - 78) **Hawkins**, C.L.; Davies, M.J. (1996), Direct detection and identification of radicals generated during the hydroxyl radical-induced degradation of hyaluronic acid and related materials; *Free Rad. Biol. Med.* 21(3): 275-290
 - 79) **Moseley**, R.; Waddington, R.; Evans, P.; Halliwell, B. and others (1995); *Biochem. Biophys. Acta* 2144 (2-3): 245-252
 - 80) **Rees**, M.D.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. (2005); Oxidation of heparan sulfate by hypochlorite: role of N-chloroderivatives and dichloramine-dependent fragmentation; *Biochem. J.* 391(Pt1):125-134
 - 81) **Rees**, M.D.; Davies, M.J. (2006); Heparan sulfate degradation via reductive homolysis of its N-chloroderivatives; *JACS* 128(9): 3085-3097.- doi:10.1021/ja0577239
 - 82) **Mourier**, P.; Viskov, Ch. (2005); Method for detection and quantification of glycoserine in a sample of heparin or heparin products; *Eur. Pat. Appl. EP* 2314631 A2
 - 83) **Becatti**, D.; Capila, I.; Gunay, N.S.; Roy, S.(2011); Evaluating heparins preparations; *US Pat. Appl.* 2011 0207918

- 84) **Lima**, M.A.; Rudd, T.R.; de Farias, E.H.C.; Ebner, L.F. and others (2011); A new approach for heparin standardization: combination of scanning UV spectroscopy, nuclear magnetic resonance and principal component analysis; PlosOne 6(1): e 15970.- journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0015970.PDF
- 85) **Gunay**, N.S.; Lech, M.; Schaeck, J.; Ozug, J. and others (2012); Evaluating Heparin preparations; Int. Pat. Appl. (WIPO-PCT) Publ. Number WO 2012/115952 A1
- 86) **Wang**, Z.; Chi, L. (2018); Recent advances in mass spectrometry analysis of low molecular weight heparins; Chinese Chem. Letters (CCL) 29(1): 11-18.- http://html.rhhz.net/zghxkb/20180102.htm#outline_anchor_8
- 87) **Krebs**, K.G.; Heusser, D.; Wimmer, H. (1969); "Spray Reagents" in "Thin Layer Chromatography; a laboratory handbook" (Stahl, E. ed; Springer-Verlag; ISBN 0-387-04736-0): 854-908 (reactive 204)

TÓPICO 2

**Expansores plasmáticos de base proteica.
Producción Química**

2.1) Introducción y revisión de antecedentes bibliográficos

El objeto del presente documento es la revisión histórico- bibliográfica de las características y de los métodos de producción de los expansores plasmáticos preparados a base de proteínas (en general, de origen animal). Si bien los expansores de base carbohidratídica están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes (fácilmente asequible por doquier), los expansores preparados a base de proteínas no ocupan un volumen bibliográfico de tamaño magnitud. Independientemente de las ventajas biofarmacológicas de una y de otra clase de estos productos farmacéuticos (sobre los cuales el autor no entrará en detalle pues escapa totalmente a su área de competencia), parece cierto que no es sencillo encontrar una revisión sobre la naturaleza de los expansores de base proteica así como una discusión de sus métodos de producción; en este trabajo no se consideran los hemoderivados, tales como la seroalbúmina humana (profusamente usada como expansor), pues no son producidos químicamente, sino aislados y purificados a partir de sangre o plasma de donantes humanos. De la misma manera, aunque sean nombrados, no serán discutidos los expansores plasmáticos obtenidos biotecnológicamente por las mismas razones, dejando su revisión a los especialistas correspondientes. De manera que esta monografía se centrará en la naturaleza y producción de aquellos expansores que utilicen como materia prima de partida, proteínas de origen animal. Habitualmente, tales proteínas son baratas, asequibles, producidas industrialmente y susceptibles de ser modificadas por semisíntesis en orden a lograr las características biofarmacológicas deseadas.

Ahora bien, los expansores de volumen plasmático (soluciones que se inyectan por vía endovenosa con fines de reposición de volumen sanguíneo perdido por cualquier causa patológica o traumática) se han clasificado en coloides y “cristaloides”. Entre los así denominados cristaloides (término no adecuado desde el punto de vista químico, pero universalmente aceptado por la práctica médica), se encuentran electrolitos o sustancias orgánicas de bajo peso molecular constituidas por un solo tipo de moléculas idénticas entre sí, por ejemplo, dextrosa (en solución al 5%, 10%, 25% en agua destilada, estéril y apirógena). Ejemplo de electrolitos son las soluciones parenterales de cloruros de sodio, potasio, etc., las cuales pueden ser isotónicas (solución fisiológica o salina, NaCl 0,85%) o hipertónicas (caso de las soluciones salinas al 7,5%) (1).

Dentro de los coloides se encuentran fundamentalmente las soluciones parenterales de polisacáridos tal como los dextranes y los derivados de almidón, por ejemplo, hidroxietilalmidón (hydroxyethyl starch, HES), y soluciones coloidales de origen proteico, las cuales, a su vez, pueden ser de naturaleza autóloga o heteróloga. Los de naturaleza autóloga son plasma humano y seroalbúmina humana, y entre los de naturaleza heteróloga, las soluciones parenterales de proteínas animales (no humanas), habitualmente modificadas por semi-síntesis y adecuadamente purificadas, fundamentalmente, derivados de la gelatina (2). De lo expuesto resulta evidente que los “cristaloides” son sustancias monodispersas y, naturalmente, los coloides son sustancias más o menos polidispersas, presentando diversidad de pesos moleculares, sean éstos el M_w (peso molecular promedio pesado), M_N (peso molecular promedio en número), M_v (peso molecular viscosimétrico), M_P (peso molecular correspondiente al máximo de la curva del gráfico de distribución molecular, también denominada “perfil molecular”).

Aunque entre el uso de ambas categorías de expansores han existidos y existen fuertes controversias en lo relativo a la inutilidad del empleo de coloides (3), es indudable que la práctica médica utiliza profusamente estos tipos de soluciones, en donde se incluyen además, polímeros totalmente sintéticos, tales como la polivinil pirrolidona (PVP).

El Health Technology Inquire Service (Canadá) ha publicado lineamientos guía sobre el uso de albúmina humana versus los expansores plasmáticos sintéticos, en donde se revisa autorizadamente el costo-beneficio del empleo de ambas clases de productos y se describen las diferentes clases, así como la aparición de nuevas generaciones de expansores plasmáticos (4). Se remite al lector interesado, al estudio de este excelente documento. Miranda y colaboradores (5) han actualizado los distintos aspectos del uso y descripción de las soluciones utilizadas como expansores plasmáticos, describiendo la fisiología del medio interno y las características e indicaciones de las soluciones cristaloides y coloides (albúmina humana, dextranos, almidones y gelatinas modificadas). Investigadores indios e iraníes (6) (7) han presentado recientes avances en el campo de las investigaciones referentes a la obtención de sangre artificial (reemplazo de la sangre natural); de estos documentos pueden extraerse los siguientes criterios, sobre los que se basa la constitución de “sangre sintética”, a saber:

- Transportadores de oxígeno basados en la hemoglobina.
- Hemoglobina humana recombinante.
- Hemoglobina humana activada superficialmente con polietilenglicol-maleimida.
- Hemoglobina humana polimerizada con enzimas.
- Células madre hemoglobínicas.
- Hemoglobina humana polimerizada (glutaraldehído) o intramolecularmente enlazada entre las unidades α y β .
- Perfluorocarbonos (hidrocarburos totalmente fluorosustituidos), los cuales facilitan la transferencia del oxígeno desde la hemoglobina a los tejidos; dada su in-

solubilidad en el seno acuoso, se administran bajo la forma de emulsiones que utilizan como emulsionantes lecitina o bien polímeros de cadena corta, tales como el Pluronic F-68®.

Durante el año 2011, ha sido publicado un muy interesante documento por la Agencia Central de Inteligencia de los EEUU (CIA) describiendo en detalle los trabajos que, en este campo, fueron llevados a cabo en la ex URSS y publicados en épocas de la denominada Guerra Fría (8). La citada revisión crítica trata extensamente el problema histórico del desarrollo (con particular énfasis en la producción industrial) de los expansores plasmáticos, investigaciones fuertemente estimuladas por las necesidades surgidas de la II Guerra Mundial, puntualizando los requerimientos que debe cumplir un expansor plasmático o sustituto sanguíneo. Entre los 24 requisitos citados en (8), se destacan los siguientes aspectos técnicos:

- Alta asequibilidad de la materia prima con bajos costos.
- Métodos de producción sencillos que generen productos de calidad uniforme.
- Estabilidad elevada frente al almacenamiento, lo que proporciona seguridad frente a la producción industrial a escala completa.
- Adecuabilidad para el secado (ausencia de la necesidad de transportar agua).
- Soportar la posibilidad de re-esterilizaciones sucesivas sin alteración de sus propiedades químicas y biofarmacológicas.

Se puede observar que algunos de estos requerimientos técnicos, se refieren a necesidades surgidas en estado de beligerancia; asimismo, plantea las fuentes de obtención de coloides de naturaleza proteica (gelatina, caseína, suero o plasma animal adecuadamente desespeciado con fines de evitar la respuesta anafiláctica). Interesantemente, en esas épocas tempranas se describen los expansores plasmáticos derivados de proteínas vegetales (por ejemplo, Biorastin LIPK). También se menciona (8) la obtención de expansores a partir de sangre humana inútil (coagulada o procedente de los campos de batalla), sometiendo estos residuos a hidrólisis ácida controlada. Por supuesto, la revisión (8) también cita el desarrollo de expansores a base de polisacáridos modificados, así como el uso de productos derivados de la síntesis orgánica, tal como el alcohol polivinílico o la PVP. Moffitt (9) revisa autorizadamente la evolución histórica de los trabajos sobre expansores plasmáticos comenzando con los primeros experimentos llevados a cabo por Czerny (10) sobre la infusión IV de goma arábica o gelatina a animales de laboratorio, destacando el uso de plasma humano congelado, fracciones proteicas plasmáticas de origen humano, así como derivados de proteínas animales heterólogas (gelatina, oxipoligelatina). Fritsch (11) revisa cuidadosamente los derivados de gelatina producidos de colágeno animal, esto es:

- Oxipoligelatinas de peso molecular medio 30.000 Da (5600- 100.000).
- Succinil gelatinas, de peso molecular medio 35.000 Da (10-100 kDa).
- Polímeros urea- gelatina, de peso molecular medio 35.000 Da (4,3-280 kDa)

Se proporciona además una interesante discusión de las respectivas actividades biofarmacológicas.

Farrugia (12) revisa los métodos para obtener albúmina humana a partir de plasma del mismo origen, describiendo también los distintos tipos de gelatinas (entrecruzadas, succiniladas, etc) con su correspondiente concentración de administración, su peso molecular promedio (30-35 kDa) y su vida media in vivo. Se remite al profesional estudioso a la lectura de las referencias (8) (9) (11) (12).

2.2) Expansores plasmáticos obtenidos de proteínas animales exceptuando hemoglobinas y gelatinas

Karl Baer (13), referencista de la Biblioteca Médica de las Fuerzas Armadas de los EEUU, ha efectuado un eminente trabajo de colección de referencias bibliográficas sobre el tema de expansores plasmáticos en general, entre los años 1940 y 1951. En este libro, Baer incluye las referencias de las investigaciones llevadas a cabo en la URSS y en el Japón durante ese lapso. De este monumental acopio de datos, se puede extraer la naturaleza de las proteínas animales ensayadas con tal finalidad:

- Suero bovino desespeciado (DBS por sus siglas en inglés) y plasma o suero de origen fetal. La desespeciación conducente a la falta de antigenicidad se lograba a través de tratamientos alcalinos suaves, y en forma insegura, por tratamiento térmico en presencia de formol.
- Seroalbúmina bovina (bovine serum albumin, BSA) tratada en medio alcalino.
- Suero de oveja.
- Caseína adecuadamente hidrolizada con papaína (capaína).
- Lactoalbúmina bovina.
- Gelatina bovina de hueso (oseína) o de pescado (isinglass) hidrolizada por calefacción en medio acuoso y depirogenado por tratamiento con H_2O_2 .
- Derivados de gelatina (oxipoligelatinas, ver 2.4).
- Ovoalbúmina tratada con álcali.

Si bien la necesidad de sustitutos plasmáticos se hizo visible durante la I Guerra Mundial, no fue sino hasta el comienzo de la II Guerra Mundial en que los sustitutos del plasma humano fueron seriamente considerados.

En el caso de los trabajos sobre caseína hidrolizada con proteasas, la preparación se logra digiriendo caseína técnica con papaína a 70°C y pH 5,8 (14). La proteína no digerida y polipéptidos de alto peso molecular se precipitan por adición de ácido tricloroacético, con lo cual, finalmente, se logra una solución acuosa conteniendo aminoácidos libres y oligopéptidos de hasta 8 aminoácidos. El material, depirogenado y esterilizado, puede ser almacenado largo tiempo sin aparición de turbiedad (14). Tales hidrolizados de caseína fueron muy utilizados en Alemania durante la II Guerra Mundial, bajo el nombre de “capaína” (15). En estos procesos, la adición de ácido tricloroacético y su engorrosa eliminación posterior, pueden reemplazarse sencillamente ultrafiltrando la solución de caseína digerida a través de una membrana de UF de cut-off 10kDa, cuyos permeatos no precipitan por la adición de ácido tricloroacético (observaciones personales del autor, no publicadas).

Damaskus (16) efectúa interesantes descubrimientos trabajando con hidrolizados de caseína, plasma y fibrina. El citado investigador resuelve el problema de formación de espuma durante la liofilización de estos hidrolizados proteicos, asociándolos en proporción (2+8) o (2+9) con gelatina hidrolizada por calefacción de su solución acuosa en reactor cerrado a una temp. de 121°C y presión de 1 atm. durante 3 hrs. Con este procedimiento se logra también una efectiva y rápida disolución del liofilizado, aún cuando el mismo contenga dextrosa. En esta investigación se hace foco en un problema común en este tipo de hidrolizados proteicos (y en especial, de los caseínicos), que es la aparición de turbiedad e incluso precipitación con cortos tiempos de almacenaje: en principio, este problema estaría resuelto con este método patentado. El presente autor ha trabajado con soluciones de caseína hidrolizada con proteasas industriales (subtilisin) o bien por calefacción en medio alcalino, y efectivamente ha podido constatar la aparición de ligera turbiedad (detectable por observación a la lámpara) en estos preparados a los pocos meses de almacenamiento en estante. V.B. Díaz ha logrado una solución satisfactoria a este problema, aplicando criterios relacionados con la solución del indeseable fenómeno de precipitación de soluciones sobresaturadas de gluconato de calcio inyectable, a través de la adición de sales cálcicas de ácidos isómeros del ácido glucónico (manonato cálcico) o de sus ácidos relacionados (lactobiónico, maltobiónico, glucoheptónico) (17); en efecto, cuando al hidrolizado proteolítico o alcalino de caseína se le ajusta el pH a valores de compatibilidad fisiológica con solución concentrada de ácido glucónico, la solución resultante (adecuadamente filtrada y esterilizada) resulta perfectamente estable en el curso de varios años de almacenamiento en estante a temp. de laboratorio. El fenómeno quizá pueda explicarse por el complejamiento que efectúa el ácido glucónico sobre restos de calcio presente en la caseína original.

Con relación al empleo de suero o plasma bovino para la confección de expansores, el material proteico debe ser tratado adecuadamente en medio alcalino, con objeto de minimizar indeseables efectos anafilácticos: el responsable de la respuesta inmune es una glicoproteína (de naturaleza seromucoide) que es termoestable (18) la cual parece

ser eliminada por calefacción alcalina. Los trabajos sobre la adecuación de seroalbúmina bovina (BSA) para la obtención de expansores plasmáticos han permitido observar que la PEGilación de la proteína induce cambios conformacionales sobre la misma, lo que permite que estas preparaciones incrementen su presión osmótica y su viscosidad (19).

En lo que respecta al uso de ovoalbúmina para la preparación de sustitutos de plasma sanguíneo, los estudios tendientes a minimizar la respuesta antigénica fuerte que presenta esta proteína han conducido a su modificación por conjugación con una poliaspartamida, permitiendo con ello, la obtención de expansores plasmáticos atóxicos (20).

La queratina de lana y de cabellos humanos (procedentes de peluquerías y de salones de belleza) ha sido empleada como sus derivados (keratosa) por oxidación de la fibra humana o animal con solución de ácido peracético. La keratosa es posteriormente aislada utilizando resinas de intercambio iónico y adecuadamente purificada, rindiendo expansores plasmáticos de respuesta fisiológica sumamente aceptable (21).

Aunque no pertenezca al caso que se está tratando, resulta muy inspiradora la excelente Tesis presentada por Qi Wang (22), centrada en la polimerización de seroalbúmina humana vía glutaraldehído, lo cual soluciona el problema de la extravasación vascular de la albúmina humana tal cual que se presenta en pacientes gravemente quemados o con choque séptico, lo cual incrementa el riesgo de mortalidad. Esto da lugar a la preparación de expansores plasmáticos más seguros.

2.3) Expansores plasmáticos obtenidos a partir de hemoglobina animal:

Este tipo de productos farmacéuticos no solo permite la restauración del volumen sanguíneo faltante, sino que cumple la importante función de llevar el oxígeno (que se encuentra deficitario por efecto de la hipovolemia) a los tejidos que lo necesitan, y que un expansor plasmático “convencional” no es capaz de efectuar. De tal manera, estos transportadores de oxígeno de naturaleza hemoglobínica desarrollan importantes funciones terapéuticas. La introducción de hemoglobina libre (sin detritos de glóbulos rojos) en el volumen plasmático, modifica en forma importante el movimiento de flúidos en los compartimentos intersticiales e intravasculares, y con tal fin se han ensayado hemoglobinas sin modificaciones químicas, como así también entrecruzadas, polimerizadas y superficialmente conjugadas, por ejemplo, con polietilenglicol (PEG) (23). El descubrimiento de Bonsen et al. (24), de la compañía de investigación ALZA Corp. (Palo Alto, California) produce un hito fundamental en el tema: parte de hemoglobina humana para los expansores-repositores de O_2 (y de hemoglobina animal, para las correspondientes especies animales) y establece con propiedad la forma de polimerizar

hemoglobina (libre de debris) a partir de bolsas de sangre vencidas o descartadas por distintos motivos. La hemoglobina polimerizada acorde con este método produce polímeros de peso molecular mayormente comprendido entre 120-500 kDa. Una ventaja evidente de estos preparados es que no presentan necesidad del uso de sueros hemotipificadores, dado que no contiene estromas celulares de glóbulos rojos. Este hecho posibilita su infusión endovenosa a cualquier ser humano, independiente de su grupo sanguíneo. En el año 1992 se publica la constitución de expansores plasmáticos de base hemoglobínica de origen animal (fundamentalmente bovina) para su uso en seres humanos, sin evidencias clínicas de formación de anticuerpos detectables por el test de Ouchterlony (25). Puede ser conveniente poner en relieve los puntos sobresalientes de este descubrimiento, a saber:

- La memoria de invención presenta una muy interesante y completa revisión histórico-bibliográfica de los hallazgos previos, acompañando cada uno de ellos con una discusión crítica, lo que transforma a esta patente en una referencia bibliográfica de la mayor importancia.
- Utiliza sangre bovina de animales destinados a consumo humano como material de partida, lo que permite que la fabricación pueda llevarse a cabo a gran escala.
- Con el fin de evitar el uso del glutaraldehído como agente enlazante (debido a sus indeseables efectos tóxicos), el método utiliza un dialdehído obtenido por oxidación de adenosin trifosfato (ATP) con peryodato de sodio: esto origina la apertura del anillo de ribosa y transforma el diol en el dialdehído correspondiente. De esta manera se evita el daño glomerular y provee una adecuada retención intravascular.
- Se presentan claros ejemplos que comienzan con el tratamiento de la sangre bovina y concluyen con el producto farmacéutico final. Se incluye la obtención de intermedios, incluso a gran escala, así como un detallado esquema de la reacción de polimerización.

Kai et al. (26) describen un proceso de encapsulamiento de hemoglobina (recombinante o humana) en liposomas, acompañado o no de conjugados formados entre un complejo metálico de naturaleza protoporfirínica con seroalbúmina humana. Komatsu et al. (27) presentan la preparación sintética de un complejo hemoglobina-seroalbúmina (ambas proteínas de origen humano, bovino o recombinante). La hemoglobina puede estar intramolecularmente entrecruzada, pudiendo ser utilizadas solas o en sus mezclas correspondientes. Están disponibles en el mercado farmacéutico, productos a base de hemoglobina bovina polimerizada con glutaraldehído y adecuadamente purificada (Hemopure®; Biopure Corp.) denominados genéricamente como hemoglobina-glutámeros, existentes también para usos veterinarios (Oxiglobin®, Biopure Corp.) (28) Se remite al lector interesado al autorizado libro editado por Kim, H.W. y Greenburg, A.G. (29), el cual trata extensamente el diseño y usos terapéuticos de transportadores de oxígeno basados en el uso de hemoglobina.

2.4) Expansores plasmáticos obtenidos a base de gelatina

El autor ha publicado recientemente una descripción del uso de gelatina para la constitución de expansores plasmáticos (30), con lo cual lo allí revisado no será contemplado en la presente obra. El fascinante libro publicado por Schrieber y Gareis (31) abarca todos los aspectos teóricos y tecnológicos (incluida la preparación de gelatinas modificadas); su fácil accesibilidad exime al autor de todo comentario, excepto la estimulación a su lectura. Los riesgos y beneficios del uso de expansores a base de gelatina están bien descriptos por Saw et al. (32). Acorde con Tomiello (33), las gelatinas que son materia prima base para expansores plasmáticos, son de tres tipos:

- Succinil gelatinas o gelatinas fluidas modificadas.
- Poligelinas: modificadas por la acción del hexametil diisocianato.
- Oxipoligelatinas: químicamente modificadas por condensación con glioxal y posterior tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Las succinilgelatinas son ampliamente utilizadas en el sector farmacéutico como expansores plasmáticos, producidas por degradación de la gelatina original por tratamiento alcalino suave (hasta lograr un peso molecular medio de entre 20-25 kDa) y posterior succinilación con anhídrido succínico). La etapa de succinilación se logra exitosamente, trabajando con la gelatina degradada por álcali en solución acuosa (aprox. 5%) y adicionando anhídrido succínico en pequeñas porciones bajo constante agitación; el pH debería mantenerse constante entre los valores 7,5-8,0 (34), y completada la operación de succinilación (reacción de Schotten- Baumann), el exceso de subproductos de reacción de bajo peso molecular se eliminan vía ultrafiltración a través de una membrana de UF de cut-off 8-10 kDa, hasta reacción negativa de succinato en los permeatos. Para ello es interesante la reacción coloreada que dan las sales férricas con los succinatos (35). Ejemplo de excelentes productos presentes en el mercado son Gelofusine[®] ($M_w = 30.000$ Da; $M_N = 23.200$ Da) (36); Gelafusal[®] ($M_w = 30.000$ da; $M_N = 22.600$ Da) (37); Gelafundin[®].

Las poligelinas son obtenidas por hidrólisis intensiva de la gelatina lograda con bases fuertes hasta un peso molecular promedio de 12-15 kDa y posterior entrecruzamiento (intercatenario) con hexametil diisocianato, lo que genera puentes de urea entre las moléculas (33) (Haemaccel[®]) (38).

Las oxipoligelatinas se preparan por condensación de las moléculas de gelatina con glioxal y posterior degradación oxidativa con peróxido de hidrógeno. Gelifundol-Amarey[®] (39) es un ejemplo de producto comercial a base de oxipoligelatina. Si bien en el curso del tiempo se ha ensayado el desarrollo de otros productos (40), las tres clases de gelatinas modificadas permanecen bien establecidas como fármacos destinados a la manufactura de este tipo de expansores plasmáticos.

2.5) Expansores plasmáticos obtenidos a base de proteínas vegetales

Las proteínas de origen vegetal parecen ofrecer una extensa gama de posibilidades para el desarrollo técnico de expansores de volumen plasmático, una vez eliminados los componentes que limiten su uso debido a fenómenos de anafilaxia e inmunotoxicidad. Si embargo, tanto como obra en el buen saber y entender del autor, y a la fecha del 31 de mayo de 2019, no parece haber referencias relevantes al respecto. Es cierto que se han desarrollado composiciones farmacéuticas a base de proteínas de soja y caseína para el tratamiento del acné cutáneo y de problemas artríticos (41), pero la búsqueda efectuada por el autor ha revelado la existencia de sólo un documento patentario que documenta la invención de expansores plasmáticos a base de proteínas vegetales (42). En el primer caso, Gordon (41) desarrolla medicamentos de uso tópico con la utilidad ya citada: la proteína de soja y la caseína láctea son solubilizadas en agua a través de un tratamiento alcalino y luego sometidas a digestión enzimática a través del uso de proteasas industriales tales como la papaína. El sistema es posteriormente estabilizado vía el uso de PVP, el cual se disuelve en la solución proteica. La segunda referencia bibliográfica citada (42) es sumamente interesante y merece ser comentada destacando sus puntos fundamentales.

- El proceso está basado en la utilización de edestina, una globulina vegetal cuya estructura primaria es muy similar a la inmunoglobulina humana, con un peso molecular de 300 kDa y una estructura hexamérica, estable en solución a pH 5,8-7,8.
- La edestina es obtenida de las semillas de cáñamo, las cuales quedan como residuo indeseable luego de la extracción del aceite por métodos que utilizan dióxido de carbono líquido.
- La proteína se aísla posteriormente de las semillas con soluciones salinas y purificada posteriormente por precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio, refinándola a continuación por cromatografía en columna (resulta obvio las mejoras al método que podría introducir el uso de tecnologías de ultrafiltración/ diafiltración a través de membranas de diferentes pesos moleculares de corte).
- La edestina purísima así preparada y refinada, se disuelve en agua en concentraciones adecuadas para rendir, junto con el agregado de otros aditivos, un expansor de volumen plasmático que no parece presentar, en principio, problema alguno de inmunotoxicidad frente a su administración endovenosa.

Referencias bibliográficas

- 1) **Vincent, J.L.** (1991); Fluids for resuscitation; *British J. Anaesth.* 67: 185-1
- 2) **Huskinsson, L.**(1992); Intravenous volume replacement: which fluid and why?; *Archives of Disease in Childhood* 67: 649-653; doi: 10.1136/ad.67.5.649
- 3) **Moss, G.S.; Gould, S.A.** (1988); Plasma expanders: an update; *Am. J. Surg.* 155(3): 425-434; doi: 10.1016/S0002-9610(88)80106-5
- 4) **Health Technology Inquiry Service**, (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health) (2010); Albumin versus synthetic plasma expanders: a review of the clinical and cost-effectiveness and guidelines for use; www.cadth.ca/sites/default/files/odf/10178_plasma_protein_products_htis-2.pdf
- 5) **Mena Miranda, V.R.; Ruza Tarrío, F.; Castro, B.L.** (2001); Soluciones utilizadas en el tratamiento de la hipovolemia; *Rev. Cubana Pediatr.* 73(2): 86-94; bvs.cid.cu/revistas/ped/vol73_2_01/ped03201.pdf
- 6) **Keyhanian, S.; Ebrahimifard, M.; Zandi, M.** (2014); Investigation on artificial blood or substitute blood replace the natural blood; *Iranian J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 4(2): 72-77; ijpho.ssu.ac.ir (downloaded 23 febr. 2019)
- 7) **Goora, Y.K.; Deb, P.; Chatterjee, T.; Dot, P.S. et al.** (2003); Artificial Blood; *MJA* 59(1):45-50
- 8) **Filatov, A.N.** (1955); The problem of blood substitutes (a critical review); *Vestnik Khirurgii imeni I.I. Grekova* 76(10): 18 pages; Sanitized copy approved for release 2011/07/08; www.cia.gov/library/readingroom/docs/CIA-RDP80-00809A000700250112-8
- 9) **Moffitt, E.A.** (1975); Blood substitutes; *Canad. Anaesth. Soc. J.* 22(1): 12-19
- 10) **Czerny, A.** (1894); Versuche uber blutein dickung und ihre folgen; *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 34: 268
- 11) **Fritsch, R.** (1982); A review of plasma substitutes; *Vet. Anaesthesia and Analgesia* 10(1): 170-179; doi: 10.1111/j.1467-2995.1982.tb00318x
- 12) **Ferrugia, A.** (2011); Safety of plasma volume expanders; *J. Clin. Pharmacol.* 51: 292-300; doi: 10.1177/0091270010372107
- 13) **Baer, K.A.** (1951); Plasma Substitutes except those derived from human blood (1940-1951); Army Medical Library; Washington D.C.
- 14) **Brinkman, R.; Eerland, L.D.; Hissink, L.A.G.; Vegter, J.J.M.** (1945); Hydrolyzed casein (Capain) as a plasma substitute; *J. Lab. Clin. Med.* 30(12): 1034-1036
- 15) **Giral, F.** (1946); *Productos Químicos y Farmacéuticos* (Ed. Atlante, México DF) vol. III: 2073
- 16) **Damaskus, Ch.W.** (1962); Lyophilized protein hydrolysis suitable for parenteral administration; U.S. Patent 3.024.167
- 17) **Giral, F.** (1946); opus cit., III: 1979

- 18) **Pristoupil, T.**; Fricova, V. (1964); On the role of alpha-L-acid Glycoprotein in determining the species specificity of blood volume expanders from bovine serum; *Clin. Chimica Acta* 9(5): 491-496
- 19) **Sahu, R.K.**; Nacharaju, P.; Manjula, B.N.; Acharya, S.A. (2009); Induced plasma expander-like properties as a function of PEG-chains on extension arm facilitated PEGylation of albumin: "mushroom to brush-like" conformational transition of the PEG-albumin conjugate; *Artif. Cells Blood Substit. Inmobil. Biotechnol.* #7(6): 245-256; doi: 10.3109/10731190903356438
- 20) **Okada, M.**; Matsushima, A.; Aoyama, T. et al. (1985); Suppression of IgE antibody response against ovalbumin by the chemical conjugate of ovalbumin with a polyaspartic acid derivative; *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 76: 79-81; doi: 10.1159/00023366
- 21) **Van Dyke, M.E.** (2008), Ambient stored blood plasma expanders containing keratose; U.S. Patent 7.439.012 B2
- 22) **Wang, Q.** (2011), Synthesis of polymerized human serum albumin (Undergraduated Honors Thesis; (The Ohio State Univ.)
- 23) **Vandegriff, K.D.**; Rohlf, R.; Winslow, R.M. (1997); "Colloid Osmotic Effects of hemoglobin-based oxygen carriers" in "Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges" (Winslow, R.M.; Vandegriff, K.D.; Intaglietta, M. eds.; ISBN 978-1-4612-7363-9): 207-232; doi: 10.1007/978-1-4612-1976-7_11
- 24) **Bosen, P.**; Laver, M.B.; Morris, K.C. (1977); Blood substitute and blood plasma expander comprising polyhemoglobin; U.S. Patent 4.001.401
- 25) **Feola, M.**; Simoni, J.S. (1992); Improved blood substitute; World Patent Int. Publ. Number WO 92/13875
- 26) **Kai, T.**; Katayama, N.; Azuma, Y.; Yokoe, J. et al. (2008); Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier; U.S. Patent 7.417.118 B2
- 27) **Komatsu, T.**; Tomita, D (2014); Hemoglobin-albumin complex and artificial plasma expander and artificial oxygen carrier containing the complex; U.S. Patent 8.889.830 B2
- 28) **Oxiglobin® Product Profile (2002); Biopure Corporation CVMP/694/99-Rev1 (26 pages); © EMEA 2002**
- 29) **Kim, H.W.**; Greenburg, A.G. eds. (2013); Hemoglobin-based oxygen carriers as red cell substitutes and oxygen therapeutics (Springer ; ISBN 978-3-642-40716-1); doi: 10.1007/978-3-642-40717-8
- 30) **Díaz, V.B.** (2016); Conversión Técnica de Proteínas; valorización de desechos proteicos (AMV Ediciones, Madrid; I edición, ISBN 978-84-945558-3-1): 176-183
- 31) **Schrieber, R.**; Gareis, H. (2007); Gelatine handbook; Theory and Industrial Practice (Wiley-VCH Verlag, Weinheim; ISBN 978-3-527-31548-2); www.doc-collection.me/doc/Gelatine_Handbook_tagt.pdf

- 32) **Saw, M.M.**; Chandler, B.; Ho, K.M. (2912); Benefits and risk of using gelatin solution as a plasma expander for perioperative and critically ill patients: a meta-analysis; *Anaesth. Intensive Care* 40: 17-32; doi: 10.1177/0310057x1204000104
- 33) **Tomiello, F.L.** (2010); "Gelatinas; Tipos y características" en "Farmacología de los Fluidos Coloides y Cristaloides": 37 pp; www.tomiello.4mg.com/rich_text.html
- 34) **Observaciones no publicadas del autor**
- 35) **Vogel, A.I.** (1959); *Química Analítica Cualitativa* (Ed. Kapeluz, Buenos Aires; IV Edición): 337-338
- 36) **Gelofusine® (2007)**, Braun Melsungen AG; Leaflet 340/NP34048/1107
- 37) **Gelafusal® (2010)**, data sheet (Biomed Ltd.; New Zealand)
- 38) **Haemaccel® (no date)**; **Thera Select GmbH**; mufel.net/plm/preds/42326.htm
- 39) **Gelifundol-Amarey®**, www.medicamentos.com.mx/DocHTM/22559.htm
- 40) **Pristoupil, T.** (1965); On the binding of gelatine to modified serum proteins through formaldehyde in an experimental blood volume expander; *Cell. Molec. Life Sci.* 21(2): 194-194; doi: 10.1007/BF 02141879
- 41) **Gordon, A.L.** (1997); Enzyme-modified soy and soy/casein combination healing compositions; U.S. Patent 5.681.586
- 42) **Horska, I.** (2005); Agent for substitution of blood plasma and a method of its production; Int. Pat. Appl. WO 2005/058332 A2 (also published as EP 1.727.553 B1; Chinese Pat. Appl. CN 1.972.699 A)43)

TÓPICO 3

**Complejos Orgánicos y Quelatos de Microelementos
útiles en Sanidad Animal. Producción Química**

3.1) Introducción

La presente monografía pretende efectuar una revisión histórico-bibliográfica de las características de los métodos de producción química de complejos metálicos generalmente utilizados en la prevención de enfermedades de carencia y/o preservación de la sanidad animal; estos complejos pueden ser utilizados según distintos criterios, ya sea como aditivos y suplementos en la dieta de los animales, o bien formando parte de medicamentos administrados según los métodos indicados por la Medicina Veterinaria. En particular, este documento está enfocado en el tratamiento de complejos y quelatos de los denominados “micronutrientes metálicos” o “microelementos”, dejando de lado aquellos elementos considerados macronutrientes, los cuales son necesitados en mayor cantidad por el organismo animal.

Tanto como ha comprobado el autor, la información sobre este tipo de complejos es muy abundante en lo relativo a la fisiología de estos microelementos, sus enfermedades de carencia y su facilitación del manejo zootécnico; sin embargo, los métodos de preparación sintética de tales sustancias aparecen dispersos y poco publicados en la literatura científica, estando la mayoría de dicha información contenida en la bibliografía de patentes. El autor cree que una revisión de esta información bibliográfica fragmentada puede ser útil para el profesional estudioso o para el técnico que se enfrente con la tarea de preparación de los citados complejos de estos microelementos; al respecto, el selenio y el yodo son microelementos no metálicos, sin embargo, también serán revisados en cuanto sean administrados bajo la forma de complejos.

Al igual que sucede con las plantas y también con los seres humanos, los microminerales (también denominados microelementos, elementos-traza u oligoelementos) son nutrientes que no aportan energía y sin embargo realizan importantes funciones en el organismo animal (1). De acuerdo con Fernández Oller (1), hay siete macroelementos fundamentales, que son calcio, fósforo, sodio, cloro, potasio, magnesio y azufre, y ocho microelementos esenciales, necesarios en cantidades traza, a saber: hierro, cobre, zinc, cobalto, manganeso, molibdeno, selenio y yodo. Como ya se ha dicho, esta revisión bibliográfica no incluye a los citados macroelementos.

Si bien los microelementos deben ser administrados en las concentraciones adecuadas, éstas cambian en las distintas etapas del desarrollo y crecimiento del animal, y

aún con los distintos géneros y especies (1). Por tal motivo, el nivel de concentración óptima administrada es difícil de establecer “y la mayoría de las estimaciones se basan en el nivel mínimo requerido para superar la deficiencia de un síntoma y no necesariamente para promover la productividad” (1). En su documentada obra, Urroz Madrigal (2) establece un número inferior de microelementos (Fe, Cu, Co, Zn y I), necesarios en valores inferiores a las 50 ppm. Sin embargo, debe insistirse en que el tipo de microelementos y su concentración expresada en mg/kg de dieta seca (o sea, ppm) cambia conforme género y especie del animal. En un trabajo sobre la nutrición de salmónidos, Laraín (3) establece que los microelementos fundamentales para los mismos son el Fe, Cu, Mn, Zn, Se y I, necesarios en dosis inferiores a las 100 ppm sobre dieta seca. En el caso de bovinos, los microelementos necesarios son el Co, Cu, Fe, Mn, Zn y Se, requiriendo el yodo en concentraciones de hasta 0,5 ppm (4) (5). El zinc, cobre, hierro y selenio (además del cromo) intervienen activamente en varios componentes de la inmunidad innata, interviniendo en procesos en los que participan radicales libres (6). Sin embargo, se debe hacer notar que el cromo ha sido citado como uno de los microelementos que producen efectos adversos en los animales (4). En resumen, la importancia fisiológica de los microelementos está documentada abundantemente y en forma fácilmente disponible para el lector interesado (7) (8).

Aunque en principio parece ser que el hierro, cobre y zinc son los microelementos más importantes para el buen funcionamiento de la fisiología animal, el estudio profundo de la cuestión indica que en realidad los 8 microelementos citados son fundamentales, presentando diferentes efectos en la fisiología animal. En estos estudios, efectuados a campo, intervienen multiplicidad de factores además de los ya citados, tales como el contenido de dichos elementos en suelo y forrajes, la dinámica del metabolismo animal, etc. La valoración de estos elementos en el tejido animal también ofrece una dificultad, dado que la medida de los mismos en sangre no siempre es la opción indicada: el hígado es mejor marcador que el tejido sanguíneo a la hora de valorar los tenores de Cu, Mn, Se y Zn. Por lo demás, la sangre es un material de elección para la valoración de hierro y yodo (9). Todos estos aspectos ofrecen grandes desafíos a la labor diagnóstica del médico veterinario o del zootecnista, y este aspecto no es menor, sobre todo en el tratamiento de animales susceptibles de manejo zootécnico, tales como aquellos destinados a consumo humano. Diversos microelementos presentan diversa actividad frente a diferentes requisitos de la fisiología animal: zinc y cobre son importantes en la respuesta inmune y en la generación y reposición de queratina en el pezón de la vaca lechera así como en la salubridad de la ubre en general; manganeso y cobalto también parecen intervenir en estos efectos (9). La suplementación con zinc disminuye la incidencia de patologías de las pezuñas, así como parece estar fuera de dudas la importancia de la suplementación con yodo (9). Habitualmente la proporción Zn:Cu presente en los complejos suministrados es de 5:1 p/p, y si bien el cromo ha sido citado como tóxico (4), se debe hacer notar que parece ser un microelemento necesario

y de actividad bien reconocida (6) (9). De hecho, existen preparados comerciales que incluyen cromo en su composición (Microquel® Layer 6 in 1 PX). Los elementos-traza habitualmente son suministrados en las siguientes formas (10):

- Bolos de liberación sostenida, de uso oral.
- Inyectables depot o de liberación prolongada, los cuales permiten una liberación lenta y controlada a partir de un carrier (que puede ser un aceite vegetal) administrados en forma subcutánea o intramuscular
- Formando parte de premezclas a administrar junto con el alimento, o contenidas en el mismo alimento.

Entre las formas orgánicas más comunes de suplementar microelementos, se encuentran complejos y quelatos del elemento con aminoácidos puros, tales como el Zn-metionina o el Mn-metionina, Cu-lisina, etc. El criterio fundamental, en el caso de la administración oral del complejo, es que su constante de estabilidad es tal que permite que el complejo sea indiferente a la acción complejante de las glicoproteínas del tracto digestivo. Sin embargo, es interesante señalar que “las evidencias de un aumento en la absorción son débiles. Los informes citados establecen que la biodisponibilidad de cobre desde Cu-lisina administrada a ovejas y vacunos fue similar a la del sulfato de cobre...”. “Se requiere la evidencia de pasaje a través del rumen, derivado de mediciones directas para confirmar estas afirmaciones de los fabricantes de suplementos” (citando a Álvarez (10)). En todo caso, la complejidad de factores ya descriptos que afectan la absorción de los citados microelementos (en donde se debe incluir la estructura molecular del complejo) parece posible que en algunos casos no presenten ventajas frente al comportamiento de la correspondiente sal inorgánica u orgánica, y en otros se logre una diferencia sustantiva. El autor deja esta discusión en manos de los especialistas competentes, y dado que la producción de estos complejos a escala técnica es una realidad industrial, el presente texto pasará a ocuparse de sus aspectos químico-técnicos. En este sentido debe tenerse presente que todo quelato es un complejo, pero la inversa no se cumple. Un complejo (o ión complejo) está formado por la unión entre un ión sencillo con otros iones de carga opuesta o con moléculas neutras (11). El ión sencillo puede estar en solución o formando parte de un precipitado altamente insoluble: la adición de la sustancia complejante genera un aumento de la solubilidad de esta sustancia insoluble: La solución de nitrato de plata, por ejemplo, reacciona al agregado de solución de cianuro de potasio precipitando cianuro de plata insoluble, el cual se redisuelve en exceso de la solución de KCN por formación del complejo argentocianuro $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$, en rigor, $\text{K}[\text{Ag}(\text{CN})_2]$, sal compleja soluble (11).; el cloruro o el óxido de plata se disuelven por adición de solución amoniacal debido a la formación del complejo argentodiamino $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ (12), y lo mismo sucede con una gran variedad de sales inorgánicas insolubles. Por otra parte, el empleo como complejante del ácido etilendiamino tetraacético (sal sódica; EDTA o mejor EDTANa_2) (G. Schwarzenbach,

1946) en la determinación de la dureza del agua, es un ejemplo de un tipo particular de complejos denominados “quelatos”, formando tales complejos con los iones Ca^{++} y Mg^{++} (13). El EDTA disódico también es denominado versenato sódico, Trilon B o Didiette (13). En general, existe un quelato cuando en el complejo tiene lugar la formación de anillos, operación denominada con el término “quelación” (pinza de un cangrejo), y no necesariamente implica que el anillo rodee a un átomo metálico: el ácido salicílico, por ejemplo, forma moléculas dobles con los solventes correspondientes, y tales moléculas dobles no contienen grupos OH que no participen de uniones hidrógeno; sin embargo, tal asociación también se conoce como “quelación” (14). Sin embargo, en lo que sigue de este texto, se utilizará la acepción más conocida, esto es, que tales complejos son productos formados por reacción entre un átomo metálico con otro ión o molécula neutra que presenta un único par de electrones (complejo monodentado): dos o más átomos donadores de electrones al átomo metálico (coordinación) forman complejos anelados bi, tri o tetradentados, generando uno o más anillos heterocíclicos que rodean al metal (15). Esta referencia bibliográfica presenta un claro detalle de los requisitos que debe cumplir un complejo para ser considerado quelato, para lo cual se citará específicamente a Martins y Rutz (15):

- El ligante debe contener dos átomos capaces de formar ligazones con un ión metálico.
- El ligante debe formar un anillo heterocíclico con un metal cerrando el anillo.
- Debe ser estéricamente (relativo al arreglo espacial de los átomos) posible de quelatar al metal.
- La relación entre el ligante y el mineral debe atender requerimientos mínimos de estabilidad.
- Estos quelatos deben presentar en la estructura, la forma de anillo siempre formado por una unión covalente coordinada entre el grupo amino y el grupo carboxílico, y el ión metálico.

Esta excelente referencia bibliográfica (15) es sumamente clara y documentada respecto de la química y bioactividad de los complejos quelato, y a ella se remite al técnico interesado. También resulta útil puntualizar los requerimientos que para la formación del complejo quelato debe cumplir el metal, esto es, tamaño y carga, valor de la energía de estabilización por campo cristalino y su electropositividad o electronegatividad (16). En general, debe tenerse en cuenta que tri, tetra y polidentados pueden formar complejos más estables que los mono o bidentados: el EDTA es un complejante de carácter hexadentado que forma complejos (quelatos) muy estables con diversidad de átomos metálicos, y por esta razón, sus aplicaciones en la Química Analítica Cuantitativa ya han sido detalladas (16). Extenderse más en este tipo de consideraciones excede el propósito de esta contribución, y para este caso se remite al lector a la bibliografía especializada (11) (12) (13) (14) (15) (16).

3.2) Hierro

3.2.1) Importancia del Hierro en la sanidad animal

Parece obvio resaltar que el hierro es un metal indispensable, no sólo para la sanidad animal, sino también para los vegetales y los seres humanos. El hierro se encuentra formando parte esencial del grupo hemo presente en la hemoglobina y mioglobina (responsables del transporte y almacenamiento de oxígeno), y aproximadamente el 90% del hierro presente en el animal está contenido en las citadas proteínas: la proteína de almacenamiento del hierro es la ferritina (aproximadamente con una concentración del metal de 20% p/p), fundamentalmente presente en el bazo. De hecho, el bazo de bovinos y equinos ha sido tradicionalmente el órgano de elección para la producción a escala industrial de ferritina, utilizada como importante antianémico de origen natural. La hemosiderina (producto insoluble de la polimerización de ferritina) puede contener hasta el 35% en peso de hierro. El metal forma parte de los citocromos, y de las enzimas catalasa y peroxidasas. Respecto de la proporción de hierro contenido en ferritina y hemosiderina, se ha establecido que constituye aprox. el 26% de su masa total en el animal. En general, la absorción de este metal es dificultosa, ya sea en animales como en el ser humano (5-10%), absorción que se realiza a nivel duodenal, pero su escasa absorción se ve compensada, al menos en parte, por la tasa de reciclo en la síntesis de hemoglobina (17) (18). Ciertas sustancias, tales como los aminoácidos lisina e histidina aumentan la absorción del hierro producida a nivel intestinal (17) por lo cual dicha absorción se ve estimulada por la formación de algunos quelatos y también por la presencia de cobre (18).

En lo referente a animales destinados al consumo humano (fundamentalmente bovinos y porcinos), la calidad de la carne está dada en gran medida por la concentración de hierro presente en la mioglobina, de allí que el aspecto y coloración de la carne depende fuertemente de esta proteína; la pérdida de coloración la convierte en menos atractiva (19). La carne es la principal fuente de hierro para el organismo humano, dado que el hierro-hemo es la forma de hierro que mejor se absorbe (mucho más importante que el hierro de fuentes vegetales), y por tal motivo tiene una importancia fundamental en la alimentación de los seres humanos (19). Un interesante informe del Instituto de Investigaciones Agropecuarias chileno (20) puntualiza la importancia de una dieta balanceada para animales bovinos, que incluya la suplementación mineral en el alimento, y, en el caso particular del hierro, se deberían relacionar los niveles encontrados en la pradera y en el plasma animal, incluyendo estudios de interacción que presenta el cobre sobre el hierro, lo cual dificulta su absorción. La suplementación con hierro en la dieta de los animales para consumo humano, no se agota con los piensos para animales mamíferos.

Seo et al. (21) han realizado un interesante estudio de comparación sobre la absorción del hierro contenido en piensos para pollos “broilers” (pollos criados en sistemas de producción a gran escala, destinados al consumo humano; también son denominados “de engorde acelerado”) suplementados con sulfato ferroso y con hierro-metionina (quelato), demostrando el incremento del tenor de hierro en distintos tejidos musculares del broiler cuando la suplementación oral se efectúa con el quelato citado en comparación con fuentes inorgánicas del metal. Frente al hecho de que los hidrolizados proteicos actúan promoviendo la absorción de hierro no-hemo en los seres humanos (22), es fácilmente deducible la validez de estos criterios en ensayos en animales. Efectivamente, los hidrolizados proteicos son capaces de quelatar un átomo de hierro cuando contiene aminoácidos libres, oligopéptidos y polipéptidos: la estructura de ciertos aminoácidos en la estructura del péptido influencia la capacidad de quelación y por tanto la biodisponibilidad del metal (22). Esta propiedad, tan interesante por cierto, fue utilizada en el pasado para el desarrollo técnico de varios productos antianémicos de uso farmacéutico, basados en la utilización de proteínas industriales claramente accesibles y baratas, tales como la caseína y la ovalbúmina ((23) y publicaciones allí referenciadas).

Pero indudablemente, dentro de la importancia que tiene el hierro en la sanidad animal, no cabe duda que uno de los capítulos más importantes ha sido el estudio de la administración de este metal a cerdos neonatos, dada la necesidad imperiosa de hierro en los primeros tiempos de vida del animal recién nacido. Naturalmente esto redundará en su eficiente manejo zootécnico. Anderson y Easter (24) han publicado una detallada revisión bibliográfica respecto de la nutrición con hierro y la necesidad de este metal en cerdos neonatos. En lo que respecta al contenido de la presente contribución, se pueden resaltar los siguientes criterios de la revisión citada (24):

- Las investigaciones sobre la biodisponibilidad de este metal en piensos es de carácter limitado, porque la anemia es de poca importancia en otros animales de granja.
- La deficiencia de hierro es crítica en cerdos neonatos criados en condiciones de confinamiento, en donde la asequibilidad de este elemento es limitada.
- El cerdo neonato es capaz de absorber hierro vinculado a macromoléculas por pinocitosis. La macromolécula preferencial es el hierro-dextrán.
- Hierro de fuentes animales (hierro-hemo) es más biodisponible que el hierro contenido en otras fuentes, por ejemplo, en vegetales, debido a que el hemo es absorbido como complejo tal cual.
- El cerdo neonato requiere 7-16 mg Fe/día, o lo que es lo mismo, 21 mg/kg de ganancia de peso.

Miller y Ullrey (25) establecen que:

- Sin el suministro de hierro, las reservas del metal contenidas en el animal duran poco tiempo. Esto se debe a la importante tasa de crecimiento del cerdo neonato comparado con otros mamíferos domésticos. El veloz incremento del volumen

plasmático hace que la mantención del adecuado nivel de hemoglobina se logre vía un importante suministro de hierro.

- Una gran cantidad de hierro no absorbido (vía oral) es eliminado por las heces.
- La administración oral de hierro previene la anemia, pero tiene la dificultad del inmenso trabajo que esto supone para el criador a escala zootécnica y la incertidumbre de que el animal haya consumido la dosis adecuada.
- Los complejos de hierro no presentan ventajas particulares sobre el uso de formas inorgánicas del metal (sulfato ferroso) frente a la administración oral.
- La administración inyectable se hace fundamentalmente en forma intramuscular bajo la forma de hierro-dextrán o hierro-dextrina, inyectando, según las condiciones, 100-200 mg de Fe, fundamentalmente como hierro dextrán, el cual se ha revelado como una de las formas más seguras: otros productos han causado efectos tóxicos y aún la muerte del animal.
- Si el cerdo neonato recibe dosis de 100-200 mg de Fe bajo la forma de hierro-dextrán oral, el efecto parece comparable al de la inyección intramuscular de la misma masa de Fe.

En un reporte presentado por la Universidad de Oklahoma (26) se comparan los efectos de la administración inyectable de hierro-dextrán versus el suministro oral del complejo hierro-metionina, estableciéndose que una única dosis de este compuesto (250 mg) puede ser suficiente para cumplir con las necesidades del animal, sin recurrir al preparado inyectable; la posibilidad de suministro oral de hierro a estos animales ha demostrado ser una alternativa exitosa frente al inyectable standard (27). Sin embargo, se debe hacer notar que existen importantes comunicaciones que hacen depender el éxito de la administración oral de otros factores, tal como la deposición de la pasta conteniendo hierro sobre la lengua del animal, o bien en el agua de bebida, así como el tipo de sustancia organoférrica (hierro quelato con aminoácidos, lactato ferroso) (inyectable standard: hierro-dextrán). Cabe destacar que la administración inyectable de hierro trae consigo indeseables resultados tales como el teñido del jamón, trauma muscular, abscesos, etc. (28). El hierro-dextrán ha demostrado su efectividad en la administración oral cuando el suministro se hace dentro de las primeras 12 hrs de vida, antes que el intestino interrumpa la absorción de macromoléculas: respetando esas condiciones y administrado por ambas vías, parece no demostrar diferencias en su efecto terapéutico y ser absorbido en grandes cantidades con menos efectos tóxicos (29). En el curso de los esfuerzos realizados por la Universidad y la Industria, el uso del complejo hierro-metionina parece ser de elección cuando de suplementar este elemento a cerdos neonatos se trata. Kegley et al. (30) efectuaron un relevante estudio sobre el comportamiento del hierro-metionina administrado oralmente a cerdos neonatos, confirmando hallazgos anteriores (hierro-dextrán oral es más eficiente que el uso oral de fumarato ferroso). Los puntos relevantes del estudio de Kegley et al. (30) son:

- Los productos ensayados fueron sulfato ferroso y hierro-metionina para uso oral; Gleptoferrón® (hierro-dextrán glucoheptonato, de respuesta similar al hierro-dextrán) como agente inyectable.
- Hierro-metionina puede ser administrado en forma segura por vía oral a las pocas horas del nacimiento o a los 3 días del mismo, sin pérdida de eficacia. Esto facilita grandemente el manejo zootécnico.
- La biodisponibilidad de hierro-metionina respecto de la del sulfato ferroso (día 3) fue 180-277%, sin efectos indeseables.

El efecto de los complejos hierro-polipéptidos administrados “per os” a otras especies animales destinadas a consumo humano también soporta una documentación abundante, en particular, complejos de Fe (II) con hidrolizados enzimáticos de caseína (31).

3.2.2) Métodos de obtención de complejos férricos y ferrosos destinados a la sanidad animal:

El hierro se administra al animal bajo la forma de las siguientes especies químicas:

- Sulfato ferroso (sal inorgánica, no un complejo, y por lo tanto no será tratado en el presente texto).
- Complejos coloidales hierro-carbohidrato (vía oral o inyectable, por ejemplo, hierro-dextrán).
- Complejos con aminoácidos puros, por ejemplo, hierro-metionina para uso oral.
- Complejos con péptidos y proteínas de distinto origen, cuya denominación anti-gua es “proteínatos de hierro” (vía oral).
- Sales-complejos de ácidos carboxílicos, tales como el hierro gluconato, hierro fumarato, hierro citrato.

3.2.2.1) Complejos coloidales hierro-carbohidrato:

Los complejos férricos y ferrosos con carbohidratos administrables por vía oral o inyectable fueron revisados recientemente en un libro del presente autor (32), cubriendo sus métodos de síntesis y su caracterización analítica; su inmediata asequibilidad hace innecesario todo comentario al respecto. En el caso de estos preparados, así como con los proteínatos de hierro, puede ser prudente ensayar en la formulación el agregado de coadyuvantes (sorbitol, manitol), los cuales ayudan a la biodisponibilidad del hierro no-hemo.

3.2.2.2) Complejos con aminoácidos químicamente puros:

Probablemente, el complejo férrico o ferroso quelatado con aminoácidos puros sea el hierro-metionina, lo cual no es excluyente de la utilización de otras formas complejas, tales como el hierro-lisina. Seo et al. (21) han reportado un método sintético para el

complejo hierro-metionina, el cual consiste en una adaptación de criterios anteriormente publicados para la síntesis del cobre-metionina (adecuadamente referenciados por Seo et al.). El método consiste en la reacción de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con metionina en la relación molar de 1:2, logrando una tasa de formación del complejo en solución acuosa sumamente aceptable. Sin embargo, los métodos sintéticos de este quelato fueron desarrollados con mucha anterioridad. Anderson y Abdel-Monem (33) obtienen patente para el entonces novedoso complejo hierro-metionina destinado a la suplementación oral de hierro y metionina en animales. Este documento reivindica la obtención del complejo férrico y ferroso bajo la forma de sus sales (cloruro, sulfato) destacando que la metionina es uno de los aminoácidos esenciales para el organismo animal, sólo asequible a través de la ingesta. Por lo demás, esta patente enseña claramente la obtención de complejos férricos, ferrosos y ferroso-férricos, en relación molar 1 Fe: 2 Met. La solicitud de patente presentada por investigadores de la Zinpro Corp. (Minnesota) (34) merece ser destacada, al igual que la anterior, por los siguientes motivos:

- Presenta una excelente memoria histórica, sumamente completa en bibliografía científica y técnica.
- Establece que sólo los complejos del metal con L-metionina son biodisponibles, dado que la síntesis que utiliza el aminoácido racémico proporciona el 50% del complejo conteniendo la forma D del aminoácido, la cual no es natural.
- Describe con absoluta claridad la preparación sencilla de los complejos de Fe, Zn, Cr y Mn con el citado aminoácido en su forma L.

En 1996, nuevamente la Zinpro Corp. publica un nuevo descubrimiento (35), consistente en que los complejos 1:1 de Zn-Met y Mn-Met mejoran su solubilidad en agua por la adición preferencial de cloruro férrico (15-30 moles Fe % moles de Zn o Mn); los complejos obtenidos contienen como anión el HSO_4^- , de manera que se trata de las estructuras ZnMet.HSO_4 y MnMet.HSO_4 .

Ciribolla (36) describe un interesante hallazgo, que consiste en hacer reaccionar hidroxianálogos de metionina con carbonatos de metales de transición (Zn, Co, Cu, Mn y Fe) y también con los alcalinotérreos Ca y Mg. La reacción en el seno acuoso consiste en la reacción del aminoácido con el carbonato correspondiente, con lo cual se verifica la evolución de CO_2 . Se utiliza preferencialmente la relación molar 2Met: 1Metal. También se encuentra detallada la preparación de los complejos de los citados metales con metionina (37), a través de los correspondientes hidróxidos metálicos. Una modificación al método anterior ha sido expuesta por Ramu (38), el cual obtiene los quelatos de diversos metales tales como el Fe, Cu, Co, Mn, Zn, Cr e incluso Se con múltiples aminoácidos (pero haciendo foco en la metionina). Los complejos se obtienen como los correspondientes hidróxidos, insolubles en agua. La síntesis de Fe(II)-Met fue descrita empleando un método de microondas en donde los reactantes se encuentran en estado sólido, lo cual representa una ventaja interesante (39). Se encuentra descrito un nuevo

tipo de quelatos formados entre un microelemento con sustancias macromoleculares tales como los ácidos húmicos (40), de aplicación tanto fitosanitaria como suplemento dietario para hombres y para animales. Además de una extensa descripción histórica de los antecedentes bibliográficos, la citada patente se centra en la obtención de quelatos de oligoelementos de naturaleza heteromolecular, en donde uno de los complejantes es ácido húmico y el otro es un complejante multidentado sencillo, tal como los hidroxiaácidos cítrico, glucónico, málico, succínico, etc. sin excluir aminoácidos, péptidos, diversos azúcares e incluso aminas. El proceso es apto para el complejamiento de Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Mo, Se y aún B. Este relevante documento proporciona un extenso número de ejemplos de preparación, incluso para algunos intermedios de reacción, con absoluta claridad, por lo que se aconseja su consulta al profesional aplicado. Ejemplos de quelatos de hierro con aminoácidos comercialmente asequibles se los tiene en el Microquel®Fe (41) (Fe-glicina); FeMet® (solución acuosa de Fe-Met. Sulfato) (42). La Association of American Feed Control Officials ha emitido su publicación oficial 2003.57.151 declarando las características que debe cumplir el complejo Fe-Met (42).

3.2.2.3) Complejos con oligopéptidos y proteínas de diverso origen (proteínatos de hierro)

K. Ramu (38) establece una clara diferencia entre un quelato aminoacídico y un proteínato metálico: mientras que el aminoácido quelato contiene uno o más anillos pentatatómicos formados por la reacción entre el oxígeno carboxílico y el α -aminogruppo del aminoácido con el elemento, un proteínato es el producto de reacción entre una sal soluble del metal con hidrolizados proteicos que pueden contener o no aminoácidos libres. La American Association of Feed Control Officials (AAFCO) ha definido a un *proteínato metálico* como el producto resultante de la quelación de una sal soluble del metal con aminoácidos y/o proteínas parcialmente hidrolizadas (43). Sin embargo, y de acuerdo con Ashmead et al. parece cierto que esta definición no siempre es adecuada, dado que un hidrolizado proteico es un producto molecularmente polidisperso con una distribución de pesos moleculares muy amplia (desde oligopéptidos hasta polipéptidos de miles de daltons), pudiendo ser que los enlaces con el metal puedan estar constituidos por otro tipo de complejo no quelato o bien por alguna otra forma de atracción iónica. Esto hace que la caracterización estructural de un proteínato metálico revista importantes dificultades, porque la estructura molecular del complejo (en sí mismo, polidisperso) también depende de las formas de fabricación y purificación, así como de los distintos métodos de obtención desarrollados para un “mismo producto”, observándose que la regularidad estructural no siempre se mantiene de lote a lote.

De esta manera, se debe entender que la química de los proteínatos metálicos, para mantener una regularidad estructural aceptable, debe tener en cuenta:

- Naturaleza y procedencia de la proteína utilizada como materia prima química.

- Grado de pureza y clase de impurezas que acompañan a la proteína madre.
- Variación de estos parámetros frente a la necesidad de cambio de proveedor, y aún de lote a lote de proteína provisto por el mismo proveedor.
- Especie de la sal metálica de partida, generalmente cloruros y sulfatos.
- Condiciones de reacción: temperaturas, tiempos, velocidad de agitación, curva de calefacción, constancia en la clase, marca y dosificación de proteasas (habitualmente, de corte inespecífico).
- Condiciones de purificación: las técnicas de ultrafiltración en sus distintos modos (concentración, diafiltración, fraccionamiento a través de tándem de membranas de peso molecular de corte definido, etc.) son irremplazables en la Técnica para este tipo de sustancias. Esto es de gran importancia, pues no todas las membranas comerciales poseen el mismo porcentaje de retención o de permeación, para cada valor de peso molecular de corte (cut-off). Por tal motivo, el tipo de membrana debería ser seleccionado durante la etapa de desarrollo y ser mantenido constante durante el escalado del proceso, desde la etapa de laboratorio a escala de banco (bench-top scale) hasta la escala industrial, pasando por la planta piloto (producción a escala de kg, kilo-lab).

Es interesante destacar que la información química sobre proteínatos metálicos está mayoritariamente contenida en los cuerpos de patentes, y no en publicaciones de corte netamente académico, y éste es un ejemplo del porqué el presente autor insiste en la consulta de literatura de patentes, sabiendo del enorme caudal de conocimientos científicos y técnicos que allí se almacenan y que no siempre se encuentran formando parte de publicaciones científicas presentadas luego de la presentación de la solicitud de patente. La bibliografía de patentes respecto del tema que se está tratando es de una cantidad abrumadora: la investigación en este campo (así como en otros tantos) ha sido llevada a cabo casi en su totalidad por investigadores industriales. Es verdad que existen disponibles relevantes tratados sobre el tema (44), pero han sido escritos por investigadores pertenecientes a la industria. En este aspecto, es notable el esfuerzo de investigación llevado a cabo por los Dres Ashmead (Albion International; UT, EEUU). Este grupo de investigadores ha presentado gran cantidad de patentes sobre el tema, cuya claridad, descripción de detalles y profundidad de la revisión histórica previa (memoria) debe ser destacada. Como es bien sabido, un hidrolizado proteico puede ser obtenido tratando la proteína madre en medio ácido o en condiciones alcalinas: ambos procesos destruyen aminoácidos constituyentes que son esenciales: la hidrólisis ácida destruye el triptófano, serina y treonina, mientras que la hidrólisis alcalina destruye arginina, treonina, serina y cistina. Se producen además aminoácidos con las formas L y D, mientras que los aminoácidos naturales son de forma L. En la técnica, esto se consigue a través del uso de enzimas proteasas (habitualmente producidas industrialmente) cuyo efecto hidrolítico no altera la configuración de los

aminoácidos resultantes (45). Por cierto, la proteína debe ser hidrolizada habitualmente antes del agregado del metal y la extensión de la proteólisis puede ser graduada suavemente en orden a obtener la presencia o no de moléculas de peso molecular demasiado elevado (e incluso la presencia de restos de proteína madre sin digerir). De esta manera, se pueden obtener interesantes proteinatos férricos y ferrosos (y también de otros metales) en forma sumamente elegante (45) (46). En general, los ligandos oligopéptidos son de tal tamaño que la composición quelatada final tiene un peso molecular medio de 1000-1500 Da (47). Es interesante destacar que para minimizar la presencia de sales producto de la reacción (presencia que puede ser eliminada por métodos de nanofiltración, cut-off 300-500 Da), pueden ser utilizados el metal elemento, o sus óxidos, hidróxidos y carbonatos, de manera que no exista formación de sales inorgánicas habitualmente aportadas por el compuesto metálico (por ejemplo, sulfato ferroso, cloruro férrico, etc.). Aunque Ashmead et al. (48) han descrito un método para obtener quelatos a partir de aminoácidos químicamente puros y que incluye el empleo de óxidos metálicos, etc., es muy interesante el descubrimiento efectuado: la reacción puede ser llevada a cabo en presencia de ácidos carboxílicos tales como el ácido cítrico, ascórbico, etc. (48). La presencia de ácidos carboxílicos promueve la solubilidad de los quelatos así como de los proteinatos de hierro y su estabilidad en seno acuoso, siendo los ácidos orgánicos de elección, además de los mencionados, el ácido láctico, málico, succínico y/o sus mezclas, tal como fué debidamente confirmado por Ericson y colaboradores (49). También se ha desarrollado un método electroquímico para la preparación de quelatos y proteinatos de hierro (y también de Zn, Mn, Cu), pero a pesar de su originalidad, no parece ser industrialmente práctico (50).

En este punto, se debe volver sobre la referencia (43), la cual presenta un importante y sencillo método de obtención de quelatos de hierro (y también de Cu, Zn, Co, Cr) vía reacción en medio sólido entre el aminoácido, óxido o hidróxido de calcio y el sulfato del metal correspondiente. La calefacción es suave, y el agua de hidratación del sulfato metálico (en este caso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) provee la humedad necesaria para permitir la reacción de quelación. Si bien (43) no se refiere a la obtención de proteinatos, el criterio es sumamente interesante. El sulfato cálcico generado en la reacción puede ser removido por disolución del producto de reacción y subsecuente filtración. Por lo demás, la revisión bibliográfica presentada en (43) es verdaderamente excelente y sumamente ilustrativa. Otras publicaciones tratan también sobre el uso de hidrolizados proteicos enzimáticos para la producción de proteinatos (51), pero no parecen diferir sustancialmente de los criterios previamente expuestos por Ashmead (45) en 1979.

Como puede verse en la presente revisión, el campo de las preparaciones de proteinatos de hierro es sumamente vasto. Pero a esto, debe agregársele el siguiente criterio, esto es: dado que el hierro en particular (y otros metales de transición en general) resultan complejados y a la vez salificados por ácidos orgánicos carboxílicos (véase 2.2.4), tales como por ejemplo el ácido cítrico, glucónico, etc, es fácil comprender que la reac-

ción de estos complejos primarios con proteínas solubles nativas o con sus hidrolizados puede conducir a la obtención de complejos macromoleculares que no excluyen una unión coordinada entre el ácido y el polipéptido. De tal forma, la proteína o su hidrolizado se adiciona al complejo binario metal-ácido carboxílico: Ejemplo de proteínas comerciales y de bajo costo pueden ser ovoalbúmina caseína, gluten, aislado de soja, etc. (51). Al momento actual, debe decirse que el criterio no es novedoso, sino que ha sido estudiado en el pasado para la síntesis de interesantes medicamentos antianémicos (23) (52) (53). En todo caso, un lineamiento inspirado en la bibliografía referenciada referida a la síntesis de un proteinato férrico o ferroso, puede ser el siguiente:

- Hidrólisis enzimática de la proteína original, utilizando proteasas industriales (generalmente subtilisin), por ejemplo, Savinase®, Esperase® (Novozymes), Purafect® (Genencor Corp.), etc., en las condiciones apropiadas suministradas por el fabricante del enzima. La proteólisis será llevada a cabo en profundidad (9-12 hrs.), dependiendo del tipo de proteína, en orden a obtener mayoría de oligopéptidos de peso molecular promedio inferior a 10 kDa.
- Reacción de complejamiento con la sal soluble de hierro. Calefacción y ajuste al pH adecuado (cercano a la neutralidad).
- Filtración abrillantante, utilizando una placa de profundidad CAS 7, CAS 40 (Compañía Sudamericana de Filtrado S.A.) o similar.
- La solución perfectamente límpida (brillante) se somete a concentración y fraccionamiento utilizando tecnologías de membrana (ultrafiltración, nanofiltración: UF, NF). El cut-off de las membranas se elige teniendo en cuenta el peso molecular medio del proteinato que se desea obtener. Sea que este valor sea de 2-3 kDa, entonces:
- Permeación a través de membrana de 8-10 kDa hasta pasaje de aprox. el 90% del volumen total, seguido de diafiltración a volumen constante del retentato con agua destilada para agotarlo de moléculas de peso molecular inferior a 10 kDa. Se reúnen todos los permeatos.
- Concentración de los permeatos reunidos a través de membrana de cut-off 350 Da, en orden a eliminar agua, sales y hierro deficientemente complejoado.
- Nanodiafiltración con agua destilada para completar la permeación de las citadas impurezas.
- Descarga del nanofiltro, filtración clarificante y secado por liofilización o secado por aspersión.
- El peso molecular medio del complejo metálico será de aprox. el valor planteado (2-3 kDa).

3.2.2.4) Sales complejos de ácidos carboxílicos:

Las sales-complejos más utilizados en el campo de la sanidad animal para el suministro de hierro son:

- Citrato férrico
- Gluconato ferroso
- Fumarato sódico

El citrato férrico y su preparación ha sido revisada recientemente y se encuentra inmediatamente asequible (54), lo que hace innecesario toda aclaración sobre el punto. El gluconato ferroso puede ser obtenido sencillamente y con elevada pureza, por simple calefacción suave bajo corriente de nitrógeno de una solución concentrada de ácido glucónico comercial con hierro en polvo en exceso 10% sobre la cantidad estequiométrica. Se observa suave evolución de hidrógeno y lenta disolución de la cantidad de polvo de hierro necesaria para reaccionar cuantitativamente con el ácido glucónico presente. El fin de la reacción se detecta por el cese del desprendimiento de hidrógeno. El líquido obtenido se filtra por placa de profundidad adecuada, lo que lo torna brillante y se separa el polvo de hierro no reaccionado; el material límpido se seca por aspersión o liofilización. El fumarato ferroso se prepara de acuerdo a dos métodos clásicos, de Bertsch y Lemp (55) el primero, y de Verner Rydh el segundo (56). El primero es el método más utilizado en la técnica, por su simplicidad: básicamente consiste en hacer reaccionar en caliente una solución acuosa de fumarato sódico con otra de sulfato ferroso. Dado que el fumarato ferroso es muy poco soluble en agua, se forma una lechada durante la reacción generada por la precipitación de fumarato ferroso, el cual se filtra, lava y seca a regla de arte. En el segundo método referenciado, se hace reaccionar ácido fumárico con una suspensión de hidróxido ferroso (preparada previamente) para formar el fumarato ferroso, el cual se aísla. La reacción se practica en ligero exceso de ácido fumárico sobre el valor estequiométrico, pues de lo contrario, restos de hidróxido ferroso sin reaccionar estarán presentes en el ppdo de fumarato ferroso. Sin embargo, la obtención a escala técnica de hidróxido ferroso es laboriosa, pues debe trabajarse en atmósfera inerte para evitar la oxidación del hierro al estado (III). En todo caso, la suspensión de hidróxido ferroso se hace reaccionar in situ con el ácido fumárico.

3.3) Cobre y Zinc

3.3.1) Importancia de Cu y Zn en la sanidad animal:

Cobre y zinc es un par importante dentro de los denominados elementos-traza, microelementos, y en ocasiones, oligoelementos. En los animales, el cobre se encuentra fundamentalmente en hígado y tejido muscular, así como también, aunque en menor proporción, en piel y huesos. Es esencial en el funcionamiento de ciertos complejos

enzimáticos, en la síntesis de colágeno, hemoglobina y pigmentos de lana y piel (57). Su carencia ocasiona pérdida del celo y aborto o directamente infertilidad en el animal, fracturas óseas y descenso de coloración en piel o pelo. El cobre se encuentra naturalmente presente en granos, paja, pasturas secas y aún directamente en el suelo. Al respecto, se debe hacer notar la relación que existe entre los tenores de sulfato, cobre y molibdeno y la biodisponibilidad de cobre en el animal: bajos tenores de sulfato aumentan el contenido de Cu y Mo hepático, produciéndose una caída en la cantidad de cobre conforme aumenta la concentración del anión. La presencia de Mo por arriba de 7 ppm origina deficiencia de cobre hepático mientras que bajos tenores de Mo generan acumulación de Cu en el órgano citado (57). Por su parte, el Zn se encuentra diseminado en todos los tejidos del animal, con preponderancia en pelo, lana, piel y huesos, y es importante cofactor de complejos enzimáticos vitales como los asociados con el funcionamiento pancreático, prostático y mecanismos de la coagulación. Aunque efectos tóxicos de este metal no parecen haber sido reportados en animales, cantidades excesivas del mismo ocasionan deficiencias de cobre. La deficiencia de zinc, en cambio, genera anormalidades óseas en porcinos, hipogonadismo, descamación de la piel, etc. (58). En los alimentos animales, el zinc se encuentra presente en el afrecho, levaduras y piensos a base de cereales (58). Estas generalidades sobre la actividad biológica del Cu y Zn, pueden ser robustecidas a través de la consulta del excelente artículo publicado por Kirchgessner (59), el cual trata sobre la utilización de los microelementos presentes en los piensos animales y los factores que influyen su biodisponibilidad. Igualmente ilustrativa es la presentación efectuada por Ledoux y Shannon (60). Ahora bien, aceptado que no siempre la dieta suministrada a los animales tiene la cantidad necesaria de microelementos, es tradicional en el manejo zootécnico, robustecer la dieta de los animales con minerales-traza, en este caso, con Cu y Zn. Como sucede con el hierro, también la forma de adición de estos metales ha sido especificada por la AAFCO (Assoc. of American Feed Control Officials), la cual, en el año 2000, declara que los metales formando parte de compuestos organometálicos, pueden ser adicionados bajo las siguientes especies químicas, a saber (60):

- Proteinatos metálicos (cobre proteinato, zinc proteinato).
- Complejos con polisacáridos (cobre polisacárido complejo, zinc polisacárido complejo)
- Aminoácidos-quelato, sintetizados en la relación de 1 mol de metal/1-3 (preferentemente 2) moles de aminoácidos; estos aminoácidos provienen de la hidrólisis exhaustiva de proteínas, presentando un peso molecular medio de 150 Da, siendo 800 Da el peso molecular medio del quelato resultante (60).
- Complejos metal-aminoácidos químicamente puros. Dentro de este ítem, AAFCO especifica la existencia de los complejos metálicos con sólo un aminoácido específico en su composición (cobre-lisina; cobre –metionina).

En ganado ovino, por ejemplo, las deficiencias de cobre y zinc fueron tratadas en el pasado a través de la administración de cobre metálico micronizado u óxido de zinc vehiculizados en aceite de oliva (61). En la suplementación parenteral de bovinos gestantes, la especie química de cobre que se ha ensayado es el glicinato cúprico (62) y en los terneros, la suplementación fue efectuada por vía parenteral inyectando cobre y zinc como sus complejos con EDTA (63). La European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMEA, hoy EMA), a través de su Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) ha presentado en forma temprana un relevante reporte (64) reconociendo los complejos cúpricos de EDTA y de metionina, así como también el gluconato y heptanoato de cobre; en sus formas inorgánicas, sus óxidos, cloruro y sulfato). Se intentará presentar ahora los métodos de producción de las diferentes especialidades químicas bajo las cuales se administra cobre y zinc a animales de manejo zootécnico.

3.3.2) Métodos de obtención de complejos de cobre y zinc destinados a la sanidad animal:

Cobre y zinc se administran al animal bajo la forma de las siguientes especies químicas:

- Óxidos, cloruros, sulfatos y metal micronizado, productos que por su naturaleza, no serán tratados en esta contribución.
- Complejos metal-carbohidratos
- Complejos con aminoácidos puros (metionina, lisina)
- Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos de cobre y zinc)
- Sales-complejos molecularmente sencillos, de naturaleza orgánica, tales como gluconatos, citratos, edetatos. Como uso tópico, cobre naftenato.

3.3.2.1) Complejos metal-carbohidratos:

Como en el caso del hierro (aunque con mucha menor intensidad), se han sintetizado complejos del cobre y zinc con carbohidratos (fundamentalmente oligo y polisacáridos), dando lugar a productos sumamente interesantes, y en este sentido, los complejos cobre-carbohidratos han sido mejor descritos y ensayados que los de zinc. Una temprana e importante investigación llevada a cabo en la ex URSS (65) estudia y describe los productos de síntesis obtenidos entre dextrán de bajo peso molecular (LMWDx por sus siglas en inglés) y el cobre; con anterioridad a este trabajo fundante, no hay registros bibliográficos dedicados a la investigación y preparación de soluciones estables conteniendo el complejo cobre-dextrán (65). Este notable estudio de investigadores soviéticos contiene puntos relevantes tales como:

- El peso molecular medio del oligosacárido de dextrán es de 3-5 kDa.
- El proceso de complejación es estudiado en un amplio intervalo de pH; entre pH

6-7, ocurren simultáneamente la complejación del cobre y su precipitación como $\text{Cu}(\text{OH})_2$.

- La mayor tasa de complejación ocurre a tales valores de pH en donde la inestabilización del sistema es mayor. El problema se soluciona vía el uso de un segundo complejante o “estabilizador” tal como el polivinilalcohol, el cual compleja el cobre a pH cercano a la neutralidad (valores fisiológicos).
- Se describe un sencillo método de preparación del complejo Cu-LMWDx a partir de CuSO_4 .

Se ha ensayado también la formación de complejos de cobre con otros derivados de dextrán (66), los cuales fueron testeados farmacológicamente (67). Aunque la referencia (32) no está dedicada a los aspectos prácticos de los complejos cúpricos, los lineamientos y conceptos allí vertidos pueden ser útiles para el técnico interesado. También han sido investigados los complejos cúpricos con oligosacáridos de celulosa, quitina y quitosano (68): mono, di y tetrasacáridos de quitosano muestran fuerte actividad complejante del átomo metálico, siendo, para el caso del tetrasacárido, la especie dominante a pH 7. El $\text{Cu}(\text{II})$ está coordinado con el alcóxido situado en C_1 y los cuatro N amínicos del oligosacárido, y la neutralidad se logra a través de la salificación con un anión (68). Se debe notar que la capacidad de coordinación de los carbohidratos en general y/o sus versiones modificadas (por ejemplo, LMWDx oxidado o reducido), con el cobre, es uno de los campos más estudiados dentro de la química de coordinación, en parte debido a la presencia de cobre en los piensos para animales y su participación en la función de elevado número de enzimas (69). Se han estudiado asimismo los complejos cúpricos con el almidón (70), así como aquellos derivados de extractos de aloe complejantes del cobre (71) para su uso en la cicatrización de heridas de piel de los animales así como para la sanidad de los folículos pilosos, promoviendo la salubridad de pelo y piel. Resulta sumamente interesante el estudio presentado por Nakanishi et al. (72), pues estos investigadores describen claramente la preparación de ácido galacturónico a partir de la pectina de citrus (en particular, pomelo y limón), la cual se degrada controladamente por hidrólisis llevada a cabo con pectinasas, y posterior fraccionamiento por UF a través de membranas de cut-off adecuado; el mismo procedimiento conceptual lo aplican a la obtención de oligosacáridos (oligomanuronatos) a partir del ácido algínico; si bien este documento no reivindica la formación y uso de complejos cúpricos de tales oligosacáridos, puede ser interesante tenerlo en mente como una excelente guía para su obtención con los fines que se están tratando.

Es importante detenerse en este punto para considerar los complejos que forman los glicosaminoglicano sulfato (GAGS) con los metales: condroitin sulfato y heparina (CS; Hep) presentan la propiedad de formar complejos muy estables con los metales alcalinotérreos (Mg, Ca) y con metales divalentes de transición (Cu, Zn, Mn) los cuales han demostrado tener interesantes aplicaciones terapéuticas en Medicina Humana.

Las propiedades farmacológicas del complejo CSCu son distintas a las de HepCu, pero en especial referencia al primero, sus actividades biológicas pueden ser agrupadas dentro de las siguientes propiedades conceptuales:

- Como carrier del citado elemento, minimizando su toxicidad (en tanto que complejo) y presentando interesantes comportamientos mímicos respecto de enzimas que poseen metales como grupo prostético, por ejemplo, superóxidodismutasa (SOD).
- Inhibiendo (en tanto que CS) la actividad de enzimas degradantes del cartílago.

Los complejos CSCu presentan otras propiedades farmacológicas además de las ya citadas, tales como anti-inflamatorias, antiflogísticas, antioxidantes y actividad capturadora de radicales libres oxigenados (responsables de la degradación del cartílago). El suministro regulado de cobre es beneficioso en el tratamiento de enfermedades degenerativas del cartílago humano, tal como la artritis reumatoidea y artritis de cadera, por fortalecimiento del tejido conectivo y en parte también por la acción mímica ya citada respecto de la SOD (inhibición de la reducción del citocromo C mediada por el radical superóxido) (73). Los complejos cúpricos pueden ser obtenidos partiendo de CS nativo o depolimerizado a distintos pesos moleculares. En los mercados centrales, existen productos comerciales a base de CS, por ejemplo, en baños para animales, pero acorde al mejor saber y entender del presente autor, y hasta la fecha del 30 Abril 2015, no se ha registrado la existencia de productos comerciales de uso tópico a base de de CuCS para la sanación de heridas, sean estos cremas, ungüentos o incluso champoos. La diversidad de ejemplos presentados en (73) son por demás explicativos. Todos los GAGS excepto keratan sulfato son capaces de complejar cobre, complejo que en solución presenta una absorbancia máxima a 237nm, resultado de un complejo de transferencia de carga entre el átomo metálico y el grupo carboxilo (74) (75), mientras que en el caso de la Hep y del dermatan sulfato (DS) intervienen, en la complejación del cobre, los grupos sulfato y carboxilo (75). Bergendhal et al. (76), trabajando sobre Hep y sus fragmentos, así como con polisacáridos heparinosimilares, descubren nuevos métodos de complejación del cobre con estos carbohidratos (métodos que se extienden al Mn, Fe y Zn); si bien puede aducirse que estos polisacáridos tienen un costo prohibitivo para que sus complejos metálicos sean viables en sanidad animal, nada impide la utilización de polisacáridos de poco valor, residuos de la producción industrial de heparina o de heparinas de bajo peso molecular (LMWH), hecho que todo experto en el arte de la producción de heparina no desconoce: en particular, heparinas parcialmente desulfatadas, heparaminas de variado peso molecular, etc. Sin embargo, a la fecha no parece haber productos comerciales a base de de estos carbohidratos y cobre para su uso en sanidad animal. Para el caso del Zn, se han desarrollado complejos con beta-glucanos derivados de *Euglena* y no de levadura (como es lo habitual) (77). Este interesante documento provee métodos de complejación “clásicos” con el metal, así como también describe la

protección del sistema inmune que estos polisacáridos proporcionan. Si bien existen complejos polisacáridicos del Zn para su uso en sanidad animal (por ejemplo, SQM Zinc 4% Protected Trace Mineral; SQMTM Protected Mineral), la identidad química del carbohidrato complejante no aparece declarada en el marbete (Ener-G-Plus 12/10 Low Starch Extruded Pellets; MID-Southfeeds®; RejuvenaideTM Plus Liquid).

3.3.2.2) Complejos con aminoácidos puros

Estos complejos, que tienen como complejante metionina o lisina en forma mayoritaria, siguen el mismo patrón de preparación ya expuesto para el caso del hierro (véase 2.2.2). Respecto de los complejos cobre-metionina, se remite al lector a las referencias (36) (37) (38), y para el ZnMet, a las referencias (34) (35) (36) (37) (38). El complejo de cobre-metionina se sintetiza con bajos rendimientos acorde con los métodos presentados por Kim et al. (78) y Lim et al. (79), los cuales fueron adaptados para la producción del complejo Fe-Met (21). El complejo cobre-lisina (Cu-Lis) fue obtenido elegantemente por Baran y colaboradores (80), por reacción en seno acuoso entre lisina clorhidrato y un ligero exceso estequiométrico de carbonato básico de cobre. La técnica es sencilla y se adapta perfectamente al escalado industrial. Por lo demás, los complejos de cobre y zinc con el aminoácido glicina se preparan en forma sencilla, bien conocida y ampliamente documentada por doquier (81) (82).

Abdel-Monem y Anderson (83) patentan la preparación y usos de los complejos de cobre, zinc y manganeso con ácido glutámico, y Ericson et al. (84) describen los complejos de cobre y zinc (y también de Cr, Co, Mo, Se, Mn) con aminoazúcares (que se referencian en este ítem y no en (3.3.2.1) dada la importancia que tiene el N amínico en estas reacciones). La referencia (43) describe un método sumamente interesante de preparación en fase sólida, bien adaptado a la síntesis de complejos aminoacídicos de cobre y zinc. De la misma manera, se debe citar el interesante documento publicado por Wheelwright y Ashmead (85), el cual describe los complejos obtenidos entre la creatina y microelementos, en particular y preferentemente, cobre y zinc; aunque la patente extiende su cobertura al Fe, Cr y Mn, lamentablemente no presenta los correspondientes ejemplos de preparación de los mismos. Este mismo grupo de investigadores descubren específicamente los quelatos del zinc con glicina y aminoácidos sulfurados (86) con exclusión de otro tipo de metales. Un interesante criterio es presentado en el año 2013 (87), según el cual los ligantes del átomo metálico son mixtos, a saber, un aminoácido puro y un polisacárido. El documento provee claros ejemplos de obtención de estos novedosos quelatos. La referencia (50) despliega métodos de obtención de quelatos partiendo de aminoácidos puros y sales de zinc y cobre (entre otros), pero adolece, como ya se ha comentado, de su falta de practicidad. Un complejo de zinc que no es estrictamente aminoacídico, es el generado por reacción entre el metal y el EDTA, cuya síntesis y caracterización fue descripta por Baran et al. (88). El quelato Zn-EDTA tiene la ventaja que puede ser utilizado por vía parenteral. En todo caso, se debe hacer notar

que, fundamentalmente y a la fecha, los complejos más utilizados de cobre y zinc para la sanidad animal, son los de estos metales con metionina, los cuales también se administran por vía inyectable (B.V.P. Copper with vitamin B12 Injection for Cattle and Sheep ®; Vet Pharm Animal Care, UK; Veticop ® 20 mg/ml suspension for injection).

3.3.2.3) Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos de cobre y zinc):

Las generalidades y definiciones sobre este tipo de complejos han sido descritas en (2.2.3). Con respecto a los proteínatos de cobre, han sido referenciados en (43) (45) (48) (51), y las mismas referencias cubren los aspectos relativos a los proteínatos de zinc. Pero en adición, Ashmead (89) obtiene patente para proteínatos no ferrosos, en particular, cobre y zinc. Este documento contiene valiosos detalles: Ashmead declara que el tenor de metal quelatado está comprendido entre el 70-80% de la cantidad total de cobre o zinc inicial, quedando el resto en solución sin complejar. Este quelato se logra por complejación del catión con proteínas hidrolizadas (fundamentalmente oligo y polipéptidos), hidrólisis obtenida preferencialmente utilizando enzimas proteasas para la digestión. El empleo de técnicas de UF aquí aportan grandes beneficios, al permitir eliminar por diafiltración (versus agua destilada), restos del metal sin complejar e incluso complejos de bajo peso molecular. Por otra parte, si se considera indeseable la presencia de complejos por arriba de cierto valor de peso molecular, el producto de reacción se puede fraccionar por permeación a través de una membrana de cut-off indicado (por ejemplo, 300-1000 kDa), con lo cual quedará en el retentato sustancias de peso molecular mayor a ese cut-off, y con el permeato se procederá a su diálisis tal como se indicó vía UF (cut-off 1000 Da) o NF (cut-off 300-500 Da). De tal manera, se pueden obtener complejos cúpricos de peso molecular medio y distribución de pesos moleculares (perfil molecular) acotado. En todo caso, siempre es prudente eliminar fracciones de alto peso molecular (proteína intacta o poco hidrolizada) debido a que su presencia puede generar problemas de solubilidad en el curso del tiempo (turbiedad, fenómenos de gelación). Tal como se describió para el caso del hierro, la administración de cobre y zinc (y de otros cationes en general) es preferible efectuarla bajo la forma de complejos, dado que de tal manera, la estructura generada protege al metal de reacciones indeseables dentro del tracto gastrointestinal, se facilita la absorción pasiva minimizando interacciones del metal con otros nutrientes y, en el caso de complejos mixtos, cada mineral dentro del quelato facilita la absorción de los otros; por lo demás, el metal complejoado se metaboliza mejor que sus formas inorgánicas, presentando menor toxicidad (90).

3.3.2.4) Sales y complejos de ácidos carboxílicos:

En el caso del cobre y zinc, entre las sales orgánicas y sales orgánicas que a su vez son complejos, se destaca la utilización de los gluconatos, citratos y edetatos. Sobre los complejos de estos metales con EDTA, véase (88). En 1998, Nelson (91) descubre un

método general (aplicable no sólo a cobre y zinc) de suplementación de dietas animales con propionatos metálicos, en particular, de cobre y zinc. Este mismo investigador (92) establece claramente los procesos de obtención de las sales-complejo del cobre y zinc con ácidos carboxílicos de C_2 y C_3 , partiendo de los ácidos anhidros y efectuando la reacción con los óxidos, hidróxidos o carbonatos de los citados metales. El citrato de cobre se obtiene según el método clásico de Maurer et al. (93), haciendo reaccionar carbonato básico de cobre (industrialmente asequible y económico) con soluciones de ácido cítrico o citrato trisódico. El complejo en solución puede ser obtenido libre de sales extrañas, e incluso concentrado o llevado por secado a su forma sólida. Otra forma preferencial de obtención de citrato cúprico está dada por la reacción de una solución acuosa de sulfato de cobre con una solución neutra de citrato de sodio/ácido cítrico neutralizado al tornasol con NaOH. El complejo precipita durante la noche, se filtra y lava con agua helada para eliminar sulfato inorgánico y se seca (94). El citrato de cobre es utilizado en el suministro de este metal junto con las aguas de bebida de ganado bovino, porcino y equino, así como también en aves de corral (Copper Blue[®]; Agri Labs Ltd., USA).

El citrato de zinc se administra menos frecuentemente de lo que se hace con el citrato de cobre, y recientemente se ha presentado un elegante método de obtención del mismo a partir de óxido de zinc y ácido cítrico (95). La variedad de complejos del ácido cítrico con el zinc han sido estructuralmente estudiados por Deng et al. (96). La preparación de cobre gluconato en forma cristalina es objeto de solicitudes de patente (97) (98), cuyos métodos no se diferencian sustancialmente de los ya clásicos (reacción del ácido glucónico con óxidos, carbonatos básicos o hidróxidos de cobre), bien aplicables a la obtención de gluconato de zinc. Existen especialidades veterinarias de uso inyectable conteniendo cobre gluconato, tal como el Caco-Iron-Copper[®] (United Pharmaceuticals Ltd.; Canada).

Otras sales orgánicas de cobre, fundamentalmente naftenatos, se utilizan en Medicina Veterinaria en tratamientos tópicos (bovinos, ovinos, equinos) como antiséptico, fungicida y astringente de heridas accidentales o patológicas (Coppercure[®], Equivet Ltd.; Canada) (Copperox[®], Univet Pharm. Ltd.; Canada). Los ácidos nafténicos son ácidos monocarboxílicos, teóricamente vinculados con el ciclopentano y sus homólogos; están contenidos en los petróleos crudos, y en los ácidos nafténicos comerciales el grupo carboxilo está preferentemente unido a una cadena lateral del ciclopentano (99). En los petróleos crudos de Rumania, California y Venezuela, los ácidos nafténicos están contenidos en una concentración de hasta el 4%, los cuales son recuperados por lavado de las fracciones de cabeza de destilación. Posteriormente son purificados por destilación al vacío. Los naftenatos de cobre y zinc pueden ser obtenidos de acuerdo a Brauner (100), por reacción del ácido nafténico comercial en estado de fusión con una suspensión de carbonato básico de cobre en amoníaco concentrado. La base nitrogenada puede ser no solo amoníaco, sino ciclohexil amina e incluso compuestos conteniendo heterociclos nitrogenados.

3.4) Manganeso y Cobalto

3.4.1) Importancia del Manganeso y Cobalto en sanidad animal:

El manganeso es un microelemento importante que desarrolla funciones en los procesos de fertilidad y de sistemas enzimáticos tales como las fosfatasas óseas y sanguíneas, entre otras. Participa en el desarrollo de las funciones del sistema nervioso central y su almacenamiento se produce en huesos, hipófisis y páncreas (101). Su deficiencia trae aparejadas diferentes patologías de carencia, tales como desequilibrio y crecimiento lento en porcinos, desarrollo óseo anormal, anomalías en los procesos de fertilidad, falta de celo, etc. En aves de corral, huevos de cáscara frágil, articulaciones abultadas, etc. El mineral es abundante en piensos que contiene salvado de arroz, trigo y vegetales verdes (101). Por su parte, el cobalto, como es bien sabido, forma parte fundamental de la molécula de vitamina B12, así como en el funcionamiento adecuado de ciertos complejos enzimáticos. Su deficiencia trae ocasionada la pérdida del apetito, decaimiento general y eventualmente anemia severa (102).

3.4.2) Métodos de obtención de complejos de Manganeso y Cobalto destinados a la sanidad animal:

Manganeso y cobalto se administran al animal bajo la forma de las siguientes especies químicas:

- Sales orgánicas (fundamentalmente sulfatos); en el caso del manganeso empleado como suplemento, la principal fuente de suministro es el sulfato manganoso, $\text{SO}_4\text{Mn.H}_2\text{O}$ (101), y también los carbonatos de ambos elementos, ya sea manganeso o cobalto.
- Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos); en el caso del manganeso, véase (45) (48) (51). Para el caso del cobalto, véase (43) (51).
- Complejos (quelatos) con aminoácidos puros, fundamentalmente metionina. Para el caso del manganeso, se encuentra revisado en las referencias (34) (35) (36) (37) (38); para el caso del cobalto, consúltese (36) (37) (38).
- Sales orgánicas molecularmente sencillas; en el caso del manganeso, fundamentalmente ascorbato (103); la preparación de sales de ácidos carboxílicos del manganeso y cobalto, ya ha sido publicada en (91) (92).
- Complejos metal-carbohidratos no son de uso extendido en sanidad animal para estos metales; de hecho, el departamento de Agricultura de los EEUU (USDA) no los tiene en cuenta en su clasificación de complejos y quelatos (104). Es cierto que existen productos comerciales que contienen en su composición complejos polisacáridicos de uno o ambos metales; sin embargo, no declaran en su formulación

qué tipo de polisacárido forma parte del complejo (por ejemplo, RangeMate High Plains Supreme 32 Biodegradable Solid Feed Supplement # 231 Z; RangeMate America, LLC). Sin embargo es previsible que tales complejos con polisacáridos puedan ser obtenidos según los lineamientos dados para el caso del hierro, cobre y zinc (véase 2.2.1; 3.2.1).

3.5) Molibdeno y Selenio

3.5.1) Importancia del molibdeno y selenio en sanidad animal:

Molibdeno y selenio es un par interesante dentro de los llamados microelementos o microminerales. El Mo es un microelemento esencial para los animales mamíferos, dada su propiedad de intervenir en el funcionamiento de varias enzimas (aldehído, sulfito y xantino-oxidasa), actuando como cofactor de las mismas (105). En los animales monogástricos que consumen alimentación rica en Mo, la administración de sulfato actúa deprimiendo su concentración en sangre, mientras que para el caso de rumiantes, incrementa la toxicidad del Mo, probablemente como resultado de la formación de tiomolibdatos en el rumen; la interacción ruminal entre Mo, Cu y sulfatos debe ser tenida en cuenta dada la mayor sensibilidad al Mo en los rumiantes que en los monogástricos (105). Las sales solubles de este elemento, tales como los molibdatos de sodio y amonio, así como el Mo contenido en el forraje son absorbidos más fácilmente que sus derivados orgánicos; no obstante, han sido desarrolladas varias formas orgánicas del Mo para la suplementación de piensos animales. Por lo expuesto, debería ser tenida en cuenta el tenor de Mo en el agua de bebida y en los forrajes, antes de proceder a su suplementación. En los animales, Mo influye la síntesis proteica así como el metabolismo del P, S, K, Fe, Cu, Zn y I₂, por lo que en algunos casos, la suplementación del alimento con Mo puede estimular el crecimiento (polluelos, truchas) (106).

Por su parte, el Se es un elemento-traza esencial en la dieta de los seres humanos y animales. Es un componente de más de 30 selenoproteínas y enzimas, las cuales son protectoras del daño producido por radicales libres. Es muy importante en el metabolismo de las hormonas tiroideas, en las funciones reproductivas, en la neuroprotección, en la estimulación del sistema inmune, etc. (107). Una condición severa de la deficiencia de este elemento es la denominada “enfermedad del músculo blanco”, patología que genera mortalidad en los neonatos (fundamentalmente de rumiantes) y afecta el crecimiento y las condiciones de producción de los animales adultos (108). Existen disponibles diversas formas de suplementos conteniendo selenio; sin embargo, su eficacia está condicionada por muchas variables, tales como el estado de salud

del animal, la especie química bajo la cual se administra, e incluso el tipo de manejo zootécnico (108).

3.5.2) métodos de obtención de complejos de molibdeno y selenio destinados a la sanidad animal:

Molibdeno y selenio se incorporan al animal bajo la forma de las siguientes especies químicas:

- Sales inorgánicas solubles en agua, tales como el molibdato de sodio o el selenito de sodio; por su naturaleza, no serán consideradas en esta contribución.
- Complejos mineral-carbohidratos.
- Complejos con aminoácidos puros, fundamentalmente metionina.
- Proteinatos: complejos con péptidos y proteínas.
- Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) enriquecidas en estos microelementos.

3.5.2.1) Complejos mineral-carbohidratos:

Los estudios de elucidación de estructura de los complejos que forma el Mo con los carbohidratos datan de la época de 1950 (109); originariamente se creyó que sólo aquellos azúcares conteniendo el sistema 1-2-3 triol (todo cis) podrían formar complejos con el molibdato; no obstante, con otras secuencias 1-2-3 triólicas también forman complejos, siendo fundamental para la complejación la existencia de este conjunto de grupos alcohólicos. Se generan así complejos cuya relación Mo: ligando es 1.1 o 1.2; monosacáridos tales como la talosa, manosa, gulosa, ribosa, xilosa, glucosa, arabinosa y galactosa, son capaces de formar complejos con el molibdato (107). Este mineral también forma complejos con polisacáridos tales como los beta-glucanos (77).

Con respecto a los complejos que forma el Se con los hidratos de carbono, la revisión de la bibliografía científica y de patentes demuestra que su uso no ha sido implementado en sanidad animal, por lo menos según consta en el buen saber y entender de quien suscribe.

3.5.2.2) Complejos con aminoácidos puros:

El compuesto aminoacídico del Se más importante en sanidad animal es, con mucho, la selenometionina, cuya discusión y lineamientos de preparación pueden ser obtenidas de (38). Recientemente, investigadores chinos han librado solicitud de patente para un método de síntesis de selenometionina (110), el cual parte del aminoácido metionina: su reacción con dimetil sulfato elimina el grupo $\text{CH}_3\text{S}-$ terminando la síntesis con metilhidroseleniuro sódico. El citado documento brinda excelentes detalles técnicos. Con referencia a los complejos del Mo con aminoácidos puros, la bibliografía se muestra más abundante: Peroxicomplejos de Mo(VI) con aminoácidos tales

como glicina, leucina y tirosina (111) fueron obtenidos por reacción entre MoO_3 , el aminoácido en cuestión y el peróxido de hidrógeno en medio alcalino. Esta publicación no indica el uso de estos complejos en sanidad animal, pero bien podrían significar una nueva alternativa. Hsu (112) obtiene la concesión de una destacada patente cubriendo preparación y usos de quelatos metálicos con aminoácidos, encontrándose el Mo entre los elementos citados. Este documento se refiere claramente al suministro de microelementos en vegetales, y no cubre sus usos en sanidad animal. Sin embargo, la sencillez técnica de su preparación y su aceptación por parte del organismo vegetal hacen pensar en este nuevo uso. El esquema de reacción está sumamente detallado en la citada patente y no es necesario abundar aquí sobre el tema, pero es interesante destacar que la sal metálica en solución acuosa se hace reaccionar con una solución ácida del aminoácido y de un ácido orgánico: esto facilita la obtención de un quelato soluble en agua dando soluciones perfectamente estables, que admiten un amplio rango de valores de pH y la adición de otros fitonutrientes, tales como fosfato, frente al cual, otros quelatos son incompatibles. Los ácidos orgánicos utilizados son, a su vez, complejantes (cítrico, malónico, tartárico, glucónico) que acompañan en la solución ácida a diversidad de aminoácidos, tales como aspártico, glutámico, asparagina, arginina, glicina, lisina, metionina, etc., de manera que lo que en realidad se obtiene como producto de reacción es un complejo en el cual participan el metal, el ácido orgánico y el aminoácido (tal como así lo reivindica el documento referenciado). El estudio llevado a cabo por Tarafder et al. (111) sobre los peroxicomplejos del Mo con aminoácidos fue robustecido por Djordjevic y colaboradores (113), quienes efectúan un completo estudio estructural de los mismos. La excelente tesis presentada por Manjola Mancka (114) puede considerarse un útil recurso para la síntesis y caracterización de complejos de Mo (también de vanadio) con fines de investigación, pero sin usos en sanidad animal. Un interesante y por demás esclarecedor trabajo fue presentado recientemente (115) en donde se describe la síntesis y caracterización de los complejos de Mo(V) con los aminoácidos glutámico, glicina y cisteína, partiendo de MoCl_5 soluble en agua (lo cual puede ser un buen ejemplo de sal soluble de Mo para implementar en los métodos descriptos en (112)). Es interesante la descripción de los dificultosos métodos de preparación que se efectúa en (115) respecto de los complejos del Mo con glicina y cisteína, así como la exhaustiva caracterización estructural de los complejos obtenidos.

3.5.2.3) Complejos con péptidos y proteínas (proteínatos):

Los complejos que forma el selenio con péptidos y proteínas fueron revisados anteriormente (51); con respecto a los proteínatos de molibdeno, es ejemplar la patente obtenida por N.L. Jensen (116), dado que enseña el complejamiento del molibdeno (hecho reaccionar como H_2MoO_4) con digeridos enzimáticos de toda clase de proteínas, incluidos aquellos obtenidos a partir de órganos y glándulas de animales sacrificados para

consumo humano. La citada patente es aplicable a gran cantidad de microminerales además del Mo, tales como Fe, Zn, Mn, Cu, Cr, Co, V, etc.

3.5.2.4) Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) enriquecidas en Mo y Se:

El criterio fundamental del enriquecimiento de la levadura de cerveza con microelementos fue planteado en 1986 por Korhola y Edelman (117), si bien se reconocen estudios anteriores adecuadamente referenciados por estos autores. En resumen, algunos puntos relevantes a destacar en (117) (a la óptica del químico industrial) son los siguientes:

- Cuando el medio de cultivo de la levadura de cerveza se adiciona con sales inorgánicas de minerales-traza, el microorganismo captura y concentra en sus sustancias vitales dichos minerales.
- La captura del microelemento se efectúa por transporte activo a través de la membrana celular y también por adsorción sobre la misma.
- La repartición del microelemento varía dentro de límites amplios, pero preferentemente se dispone unido covalentemente a macromoléculas, tales como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. El fenómeno también depende de la naturaleza del microelemento.
- Los sitios preferenciales de deposición del microelemento en la levadura son la pared celular y mitocondrias.
- El documento (117) brida los lineamientos de interesantes marchas de fraccionamiento de la levadura para establecer la concentración del microelemento en cada fracción (sean, por ejemplo, ácidos nucleicos, mitocondrias, etc.).
- En particular, el Se reemplaza al S en el metabolismo de la levadura.

En el caso del Se, se han estudiado y publicado varios protocolos de fermentación para la obtención de levadura de cerveza (también denominada “de panificación”) enriquecida en microelementos. Se ha ensayado la adición de selenato de sodio en dos niveles de concentración y con adición continua o a dosis única, obteniéndose resultados que muestran la dependencia de las condiciones experimentales (118); aquellas condiciones que despliegan mayor incidencia en la captura y enriquecimiento en selenio de la levadura, son temperatura y tiempo de fermentación, pH, tiempo y forma de agitación del seno de fermentación, tamaño del inóculo y tipo de cepa, concentración de selenio y tiempo y forma de adición de la sal correspondiente, naturaleza de la forma inorgánica de suministro de Se (selenito o selenato), naturaleza del caldo de cultivo, sea éste a base de melazas y/o con adición de glucosa como medio de suministro de carbono; en determinadas condiciones, la captación de selenio se enaltece con el uso de medios totalmente sintéticos (119) (120) (121).

La presentación de I. Nisamednitov (122) respecto del enriquecimiento de levaduras con Se es sumamente esclarecedora sobre el tema, sobre todo para el químico técnico

que no tiene por orientación natural la Microbiología Industrial. Esta excelente presentación, que grafica la producción de Alkosel® R397 (levadura enriquecida en selenio), brinda los siguientes puntos sobresalientes:

- Cepa de levadura que se caracteriza por la incorporación de importante cantidad de Se convertido en selenometionina y selenocisteína.
- Caracterización biológico-molecular del tipo de cepa.
- Métodos de incremento de la tasa de bioconversión del Se.
- Metodología a seguir desde el proceso de laboratorio hasta la producción a escala técnica.
- Influencia de la tasa de oxigenación del medio de cultivo.
- Recolección de la biomasa conteniendo el 98% del Se como forma orgánica, y posterior secado, molido y granulado.

Opcionalmente, se debe puntualizar que la masa celular colectada se puede someter a autólisis y ser transformada en el denominado “extracto de levadura” (123) el cual puede ser secado en secadero de película descendente (falling film), reduciéndolo a polvo fino apto para la formulación del suplemento que formará parte de la dieta del animal. Respecto del caso del Mo, los criterios no son conceptualmente disímiles de los expuestos para el caso del Se (extensivos también a levaduras enriquecidas en Cu, Zn, Mn). Los métodos y procesos de enriquecimiento de levaduras con Mo, desarrollados por investigadores chinos (124) se caracterizan por la selección y caracterización exhaustiva de las cepas de levadura que resultan preferenciales para la captación del Mo, condiciones de fermentación, fuente de suministro de carbono (sacarosa, maltosa) y de Mo (molibdato de amonio), etc. El producto obtenido de esta invención está reivindicado para uso humano, pero nada impediría su ensayo y aplicación en animales como fuente de suministro de Mo orgánico, tal como en el caso del Se. Sin embargo, es prudente observar que el uso de levaduras enriquecidas en Mo para suplementación dietaria en seres humanos ha sido cuestionada por la European Food Safety Authority (EFSA), declarando las dificultades para establecer la seguridad de tales levaduras y aún la biodisponibilidad del Mo a partir de esta fuente (125).

3.6) Cromo y Yodo

3.6.1) Cromo:

Anteriormente se ha detallado (véase 3.1) que algunos autores citan al cromo como uno de los microelementos que producen efectos adversos en los animales (4), en tanto otros consideran al cromo como uno de los elementos-traza que participan activamente

en los procesos de la inmunidad (6). Tales consideraciones se encuentran totalmente fuera del ámbito de incumbencia profesional del presente autor, por lo que se ha decidido considerar brevemente la preparación de compuestos organometálicos de cromo utilizados en la sanidad animal, en tanto que su preparación es una realidad industrial. En parte, la bibliografía ya revisada para el caso de otros microelementos, incluye información relativa al cromo. Tales casos son:

- Proteínatos de cromo se encuentran citados en (43) (51) (116).
- Sales orgánicas de cromo, en (91).
- Levaduras enriquecidas con cromo, (117).
- Complejos cromo-metionina, en (34) (38).

Se remite al técnico interesado a la lectura del estudio publicado por D.T. Pal y N.K.S. Gowda (126), el cual presenta una interesante introducción general al tema y un detallado estudio sobre el efecto del cromo sobre el crecimiento y lactancia en animales bovinos. Así como el complejo cromo-metionina es el más utilizado entre los quelatos de cromo, de la misma forma se han desarrollado complejos del cromo con otros aminoácidos tales como el glutámico, glicina y cisteína (127), conteniendo esta relevante publicación, detalles de síntesis que hacen innecesaria toda discusión; lo mismo puede decirse de la caracterización espectroscópica presente en el trabajo referenciado.

3.6.2) Yodo

Este no-metal participa en la síntesis de hormonas tiroideas, a través de las cuales se regula la tasa de oxidación celular. En los rumiantes el yodo se absorbe en el rumen, siendo sus signos de deficiencia el bocio, caída del pelo y retardos en el crecimiento del animal: de hecho, es el único elemento-traza cuya deficiencia se traduce en anomalías clínicamente detectables (trastornos de deficiencia de yodo) (128); las fuentes de suministro de yodo son el yoduro de potasio, yodato de potasio, yodato de calcio (el cual es más estable frente a las condiciones ambientales) y una sustancia orgánica, que es el yodhidrato de etilendiamina (a veces traducido como etilendiamino dihidroioduro) (128). En la nutrición del ganado bovino, el yodo juega un papel de la mayor importancia, la cual ha sido perfectamente evaluada y publicada (129). Respecto de la preparación de los compuestos inorgánicos del yodo anteriormente citados (ioduros, yodatos), en el presente texto no hay nada que decir. Con referencia al diyodhidrato de etilendiamina (en rigor, diyoduro de etilén diamonio), existen excelentes suplementos yodados que lo contienen (Organic Iodide Powder ®: Neogen Vet). Este compuesto puede ser obtenido por los métodos detallados en la bibliografía de patentes (130). Sin embargo, dado que la etilendiamina es una sustancia libremente soluble en agua, y el ácido yodhídrico está disponible comercialmente como solución acuosa concentrada

57% en peso, una preparación indicada puede ser disponer en solución acuosa 1 mol de etiléndiamina y proceder a gotear, bajo agitación, 2 moles de HI; al finalizar la adición, se ajusta pH= 6-7 por goteo de uno o de otro reactivo, según corresponda. La solución acuosa concentrada se liofiliza utilizando como soporte de liofilización cualquier material apropiado, preferentemente manitol, dada su indiferencia química hacia las aminas, pero se han utilizado también lactosa, sacarosa y maltodextrina.

Referencias bibliográficas

- 1) **FernándezOller, A.** (2014); Los microminerales en la nutrición animal; Agrinews; <https://agrinews.es/2014/02/18/los-minerales-traza-en-la-nutricion-animal/#prettyPhoto>
- 2) **Urroz Madrigal, C.** (2000); Farmacología y manejo de productos veterinarios; principios básicos (EUNED, San José de Costa Rica; ISBN 9968-31-096-4): 97-98
- 3) **Larrín, C.** (1993); Nutrición en Salmónidos; Arch. Med. Vet. XXV (2): 111-125
- 4) **Ramos, M.L.** (2010); Carencia de micronutrientes en rumiantes; suplementación alternativa mediante el enriquecimiento de forrajes; Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias (Univ. de Buenos Aires); repositoriouba.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_1474.dir/1474.PDF
- 5) **Rodríguez, A.; Banchero, G.** (2007); Deficiencia de minerales en rumiantes; INIA: 11-15; www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/6864/1/revis-ta-INIA-13-p.11-15.pdf
- 6) **Campos-Granados, C.M.** (2015); El impacto de los micronutrientes en la inmunidad de los animales; Nutrición Animal Tropical 9(1): 1-23
- 7) **Unger, M.; Chiappe-Barbará, M.A.** (2008); Importancia fisiológica de los micro-minerales en el metabolismo óseo; REDVET IX (10): 17 pags.
- 8) **Anónimo (sin fecha); Fisiología de los Microelementos; (Power Point; Univ. Nac. del Centro de la Provincia de Buenos Aires, UNICEN);** www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/FisiologiadelaNutricion/images/_Microelementos_Cu_Mo_Zn_Co_Fe_I_.pdf
- 9) **Glauber, E.C.** (2008); Minerales y oligoelementos en bovinos: su rol en la salud y una aproximación terapéutica; www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/minerales-oligoelementos-bovinos-rol-t27554.htm
- 10) **Álvarez, A.** (2011-2012); Evaluación de microelementos a nivel sanguíneo en vacas de producción lechera mediante la administración de sal mineral comercial y componentes quelatados inyectables en la hacienda Aychapicho Agro's del cantón Mejía; Tesis de grado en Medicina Veterinaria y Zootecnia; Univ. Téc-

- nica de Cotopaxi (Ecuador); repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/821/1/T-UTC-1180.pdf
- 11) **Vogel, A.I.** (1959); Química Analítica Cualitativa (IV Ed., Edit. Kapelusz, Bs.As.): 32-34
- 12) **Glasstone, S.** (1957); Tratado de Química Física (Aguilar, Madrid, II Edición): 872-874
- 13) **Vogel, A.I.** (1960); Química Analítica Cuantitativa (Kapelusz, Bs. As.) Tomo I: 535-537
- 14) **Pauling, L.** (1965); Uniones Químicas (Edit. Kapelusz, Bs. As.): 491
- 15) **Martins, B.; Rutz, F.** (2012); La revolución en la nutrición mineral: cómo los minerales quelatos participan en la producción animal (14 pags.); XXXVII Convención Nacional ANECA 2012; www.engormix.com/avicultura/articulos/revolucion-nutricion-mineral-como-t29489.htm
- 16) **Basolo, F.; Johnson, R.** (1967); Química de los compuestos de coordinación (Reverté S.A., Barcelona): 111-134
- 17) **Gélvez, L.** (2019) El hierro en la nutrición animal; Portal Mundo Pecuario; https://mundo-pecuario.com/tema69/microminerales_nutricion_animal/hierro-439.html
- 18) **Ureña, F.** (sin fecha); Microminerales: producción animal y gestión de empresas (Univ. de Córdoba; España); www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=144 (consultado el 20 abr. 2019)
- 19) **Beltrán García, J.A.** (2018); Importancia del hierro en la salud de los animales y de las personas; Depto de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos (Univ. de Zaragoza); bobepor.es/wp-content/uploads/2018/07/Informe-Importancia-del-hierro-en-la-alimentacion.pdf
- 20) **Sales Z., F.** (2017); Importancia de los minerales para la alimentación de bovinos en Magallanes; Informativo 77, INIA Kampenaike (Chile)
- 21) **Seo, S.H.; Lee, H.K.; Ahn, H.J.; Paik, I.K.** (2008); The effect of dietary supplementation of Fe-methionine chelate and FeSO₄ on the iron content of broiler meat; Australasian J. Animal Sci. 21(1): 103-106; doi: 10.5713/ajas.2008.70160
- 22) **Li, Y.; Jiang, H.; Huang, G.** (2017); Protein hydrolyzates as promoters of non-haem iron absorption; Nutrients 9: 609 (18 pages); doi: 10.3390/nu9060609
- 23) **Díaz, V.B.** (2016); Conversión Técnica de Proteínas; valorización de desechos proteicos (AMV Ediciones, Madrid; ISBN 978-84-945558-3-1): 167-183
- 24) **Anderson, B.K.; Easter, R.A.** (1999); A review of iron nutrition in pigs; Swine Illinois Livestock Trail (Dept. Animal Sci; Univ. of Illinois) (11 pages); livestocktrail.illinois.edu/porknetDisplay.cfm?ContentID=70
- 25) **Miller, E.R.; Ullrey, D.E.** (2012); Baby pig Anemia; Factsheet Pig 04-01-19, originally published as PIH- 34; factsheet Pork Information gateway (5 pages); porkgateway.org/resource/baby-pig-anemia/

- 26) **Maxwell, C.V.**; Sohn, k.S.; Fakler, T.M. (1993); Effect of iron source (oral vs injectable) for young pigs on weight gain, survival, hematocrit and hemoglobin; 1993 Animal Sci. Res. Report (Dept. Animal. Sci.; Oklahoma State Univ.): 321-324: www.beefextension.com/research_reports/research_56_94/93%20Research%20Reports.pdf
- 27) **Maes, D.**; Steyaert, M.; Vanderhaighe, C.; López Rodríguez, A. and others (2011); Comparison of oral versus parenteral iron supplementation on the health and productivity of piglets; Vet. Records 168 (7): 188; doi: 10.1136/vr.c7033
- 28) **Chwen, L.T.**; Heng, L.K.; Lee, T.H.; Kong, M.Ch.; Yoon, Ch.P. (2001); The effect of iron supplementation in preweaning piglets; Mal. J. Nutrition 7(1&2): 41-49
- 29) **Harmon, B.G.**; Cornelius, S.G.; Totsch, J.; Baker, D.H.; Jensen, A.H. (1974); Oral iron dextran and iron from steel slats as hematinic for swine; J. Anim. Sci. 39: 699-702; <http://jas.fass.org/content/39/4/599>
- 30) **Kegley, E.B.**; Spears, J.W.; Flowers, W.L.; Schoenherr, W.D. (2002); Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig; Nutr. Res. 22: 1209-1217
- 31) **Kupczynski, R.**; Bednarski, M.; Spitalniak, K.; Pogada-Sewerniak, K. (2017); Effect of protein-iron complex concentrate supplementation on iron metabolism, oxidative and immune status in preweaning calves; Int. J. Mal. Sci. !8: 1501 (12 pages); doi: 10.3390/ijms18071501
- 32) **Díaz, V.B.** (2017); Complejos Terapéuticos Hierro-Carbohidratos; Introducción a su síntesis y caracterización analítica (ISBN 978-987-42-5501-3); disponible desde www.victorbautistadiazquimico.com
- 33) **Anderson, D.R.**; Abdel-Monem, M.M. (1978); Iron methionine complex salts; US Patent 4067994
- 34) **Anderson, M.D.** (1992); L-form 1:1 metal methionine complexes; Eur. Pat. Appl. 0556498 A2
- 35) **Abdel-Monem, M.N.**; Anderson, M.D. (1996); Enhanced solubilization of zinc and manganese methionine complex salts by addition of ferric ion; Int. Pat. Appl. (PCT) WO 96/11907
- 36) **Ciribolla, A.** (2002); Chelates food additive and methods of preparation; US Patent 6461664
- 37) **Lee, K.H.**, Lee, S-B. (2006); Method for preparation of organic chelate; US Patent 7087775
- 38) **Ramu, K.** (2007); A method of manufacturing metal amino acid chelate hydroxides; Indian Patent 197924
- 39) **Wang, L-K.**; Li, L.; Li, X-M.; Shi, Y-H. and others (2008); Microwave assisted solid state reaction synthesis of methionine complexes of iron (II); Food chemistry 106 (1): 315-323
- 40) **García-Mina Freire, J.M.**; Baigorri Ekisoain, R.; Zamarreño Arregui, A.M.; Baicaicoa Llundain, E. y otros (2010); Complejos (quelatos) metálicos heteromoleculares de naturaleza húmica; Solic. Pat. Española ES 2335562 A1

- 41) **Microquel®Fe (sin fecha)**, Suplemento nutricional para uso veterinario (Agrovetmarket Animal Health); v1.200917 (3 páginas)
- 42) **FeMet® Liquid Iron Methionine Sulfate; specification sheet (Global Animal Products, Inc.; Texas)**
- 43) **Ashmead, H.DeW.**; Ashmead, S.D.; Wheelwright, D.C.; Ericson, C.; Pedersen, M. (2004); Composition and methods for preparing amino acid chelates and complexes free of interfering complex ions; US Patent 6710079 B1
- 44) **Ashmead, H DeW.** (2012); Amino acid chelation in human and animal nutrition (CRC Press; ISBN 978-1-4398-9768-3: e-book, PDF)
- 45) **Ashmead, H.H.** (1979); Buffered enzymatically produced metal proteinates; US Patent 4172072.
- 46) **Ashmead, H.H.** (1980); Soluble iron proteinates; US Patent 4216144
- 47) **Ashmead, H.H.**; Ashmead, De W.; Graff, D.J. (1989); Amino acid chelated compositions for delivery to specific biological tissue Salts; US Patent 4863898 (also published as Int. Pat. Appl. (PCT) WO 87/04622)
- 48) **Ashmead, H.H.** (1989); Preparation of pharmaceutical grade amino acid chelates; US Patent 4830716
- 49) **Ericson, C.**; Ashmead, De W. (2004); Enhancing solubility of iron amino acid chelates and iron proteinates; US Patent 6716814 B2
- 50) **Ashmead, H.H.** (1986); Pure amino acid chelates; US Patent 4599152
- 51) **Nassar, M.F.**; Tierney, T.T. (1987); Hydrolyzed protein chelates; Int. Pat. Appl. (WIPO- PCT) WO 87/ 02867
- 52) **Gonella, S.** (2003); Complexes consisting of Fe (III), a polyhydroxylated compound and ovalbumin; Eur. Patent EP 875249 B1
- 53) **Díaz, V.B.** (2009); Adducts of soluble albumin with trivalent iron, polyalcohol complexes and methods to produce them; Eur. Patent EP 1655308 B1
- 54) **Díaz, V.B.** (2017); opus cit.: 137- 153
- 55) **Bertsch, H.C.**; Lemp, J.F. (1958); Non-hydrated ferrous fumarate and hematinic composition thereof; US Patent 2848366
- 56) **Verner Rydh, T.O.** (1969); Preparation of anhydrous ferrous fumarate; US Patent 3478073
- 57) **Gélvez, L.** (sin fecha); El cobre en la nutrición del animal; Mundo Pecuario (3 pags.); https://mundo-pecuario.com/tema69/microminerales_nutricion_animal/cobre-436.html (consultado el 4 jun 2019)
- 58) **Gélvez, L.** (sin fecha); El zinc en la nutrición del animal; Mundo pecuario (3 pags.); https://mundo-pecuario.com/tema69/microminerales_nutricion_animal/zinc-445.html (consultado el 4 Jun 2019)
- 59) **Kirchgessner, M.** (2007); Availability of mineral in food of plant origin; Availability of some trace elements; Proc. Nutr. Soc. 24: 89-99
- 60) **Ledoux, D.R.**; Shannon, M.C. (2005); Bioavailability and antagonist of trace

- minerals in ruminant metabolism; 2005 Florida Ruminant Nutrition Symposium: 23- 37
- 61) **Lamand, M.** (1978); Copper and zinc deficiencies: treatment by intramuscular injections in sheep; *Ann. Rech. Vet.* 9 (3): 495- 500
 - 62) **Viejo, R.E.; Casaro, A.P.** (1992); Suplementación parenteral con cobre en vacas gestantes y su efecto sobre el ternero al nacimiento; *Rev. Arg. Prod. Animal* 12(3): 339- 346
 - 63) **Mattioli, G.A.; Fazzio, L.E.; Rosa, D.E.; Pico, S.J. y otros** (2008); Eficacia de la suplementación con Cu-Zn en terneros; *Vet. Arg.* 25 (242): 90- 98
 - 64) **Committee for Veterinary Medicinal Products (EMA)** (1998), Report EMA/MRL/431/98- Final (May 1998)
 - 65) **Lugovaya, Z.A.; Tolmachev, V.N.; Naiden, V.I.; Valakhanovich, A.I. and others** (1976); Reaction products of low-molecular weight dextran with copper; translated from Kimiko- *Farmatsevticheskii Zhurnal* 10 (11): 111- 113 (A.M. Gorkii University; Khar'kov, Plant of Medicinal Preparations; Minsk; Belarus)
 - 66) **Mioduszewski, J.Z.; Mioduszevska. M.** (1983); New dextran derivatives. II. Preparation of compounds of copper (II) with 3-mercapto-2-hydroxypropyl ether of dextran; *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 31 (5). 669- 675
 - 67) **Obminska- Domoradzka, B.** (1988); Effect of copper- dextran complex (C-79) in the immunity indexes in normothermic rabbits and in postpyrogenic fever; *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 36 (3): 273- 285
 - 68) **Shagholi, M.; Callahan, J.H.; Rappoli, B.J.; Rowley, D.A.** (1997); Investigation of copper- saccharide complexation reactions using potentiometry and electrospray mass spectrometry; *J. Mass. Spectrom.* 32(10): 1080-1083; doi: 10.1002/(SICI)1096-9888(199711)
 - 69) **Mitic, Z.; Cakic, M.** (2014); Pharmaceutically important complex compounds of some microbial exopolysaccharides; *Acta Medica Medianae* 53(4): 54- 63; doi: 10.5633/amm.2014.0410
 - 70) **Pickart, L.R.** (1999); Starch-metal complexes for skin and hair; US Patent 5858993
 - 71) **Pickart, L.R.** (1995); Metal complexes of aloe extracts for skin and hair; *Int. Pat. Appl. (WIPO-PCT)* Publication WO 1995026198 A1
 - 72) **Nakanishi, N.; Kitada, Y.** (1999); Mineral absorption promoting agent; US Patent 5952308
 - 73) **Federici, G.; Bertolotto, R.M.** (1991); Chondroitin sulfate complexes having anti-inflammatory activity, process for the preparation thereof and pharmaceutical composition containing them; *Eur. Patent EP 04500398* (also published as IT 9019948)
 - 74) **Toida, T.; Linhardt, R.J.** (1996); Detection of glycosaminoglycans as a copper (II) complex in capillary electrophoresis; *Electrophoresis* 17: 341- 346

- 75) **Park, J.W.**; Mukherjee, C. (1980); Spectroscopic studies on Cu²⁺ and Ca²⁺ binding with glycosaminoglycans; *Bull. Korean Chem. Soc.* 1(3): 83-87
- 76) **Bergendhal, K.H.L.**; Johansson, R.A.; Svahn, C.M.E. (1991); Novel heparin derivatives; US Patent 5039529 (also published as WO 88/09347)
- 77) **Le Brun, J.R.**; Levine, R.; Horst, G.P. (2013); Animal feed composition and methods of using the same; US Patent Appl. 2013/ 0216586 A1
- 78) **Kim, D.H.**; Um, J.S.; Ahn, S.H.; Paik, I.K. (1997); Studies on the development and utilization of copper chelate as a supplement to the pig diet; *Korean J. Nutr. Feed* 21 (5): 429-438
- 79) **Lim, H.S.**; Paik, I.K. (2003); Effects of supplementary mineral methionine chelates (Zn, Cu, Mn) on the performance and eggshell quality of laying hens; *Asian- Austr. J. Animal Sci.* 16 (12): 1804-1808
- 80) **Baran, E.J.**; González- Baró, A.C.; Torre, M.H. (2011); Spectroscopic Characterization of [Cu(L- Lysinate)₂ Cl₂]. 2H₂O; *Lat. Am. J. Pharm. (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)* 30 (9): 1862- 1866
- 81) **Imamura, T.**; Hatanaka, Ch.; Doudou, T. (1978); Preparation of copper (II)-Glycine complex; *J. Fac. Fish. Anim. Husb.*; Hiroshima University 17: 35-41
- 82) **De Farías, R.F.** (2002); Synthesis and characterization of manganese-glycine and copper-glycine adducts; *Quim. Nova* 25 (5): 729- 730; www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11399.pdf
- 83) **Abdel-Monem, M.M.**; Anderson, M.D. (2006); Metal complexes of α - amino dicarboxylic acids; US Patent 7129375 B2
- 84) **Ericson, C.**; Ashmead, DeW.; Ashmead, S.D.; Rees, A. (2010); Amino sugar chelates; US Patent 7776842 B2
- 85) **Wheelwright, D.C.**; Ashmead, S.D. (2000); Bioavailable chelates of creatine and essential metals; US Patent 6114379
- 86) **Ashmead, S.D.**; Wheelwright, D.C. (2000); Zinc amino acid chelates having ligands comprised of glycine and a sulfur-containing amino acid; US Patent 6166071
- 87) **Rabovsky, A.B.**; Ivie, J. (2013); Mineral amino acid polysaccharide complex; US Patent Appl. 2013/ 0029935 A1
- 88) **Baran, E.J.**; Wagner, C.C.; Torre, M.H. (2002); Synthesis and characterization of EDTA complexes useful for trace elements supplementation; *J. Brazilian Chem. Soc.* 13(5) (8 pages); doi: 10.1590/S0103-50532002000500006
- 89) **Ashmead, H.H.** (1980); Soluble non-ferrous metal proteinate; US Patent 4216143
- 90) **Badillo, Y.** (2016); Utilización de Fuentes orgánicas y Fuentes inorgánicas de cobre en lechones como promotor de crecimiento; *Agroindustria* 138: 20- 33
- 91) **Nelson, C.E.** (1998); Metal propionates for use as animal feed supplements; US Patent 5707679

- 92) **Nelson, C.E.**; Catron, D.H. (1998); Process for producing metal carboxylates for use as animal feed supplements; US Patent 5795615
- 93) **Maurer, G.J.**; Stefanini, V.E. (1981); Method of making an organic metallic salt or complex; US Patent 4278610
- 94) **Giral, f.** (1946); Productos Químicos y Farmacéuticos (Edit. Atlante, México); I: 555-556
- 95) **Jaracz, S.** (2016); Preparation of zinc citrate and of zinc citrate-containing oral care composition; Int. Pat. Appl. (WIPO- PCT) Publ. Number WO 2016/064412 A1
- 96) **Deng, Y-F.**; Zhou, Z-H. (2009); Synthesis and cristal structure of a zinc citrate complex $[Zn(H_2Cit)(H_2O)]_n$; J. Coord. Chem. 62 (9): 1484- 1491; doi: 10.1080/00958970802596391
- 97) **Chinese Patent Appl. CN 1040984 A (1990); Preparation of copper gluconate complex**
- 98) **Chinese Patent Appl. CN 107286011 A (2017); Copper gluconate preparing method and copper gluconate prepared with method**
- 99) **Warth, A.H.** (1956); The Chemistry and Technology of Waxes (Reinhold Publ. Corp., N.Y.; II Edition): 541- 542
- 100) **Brauner, O.C.** (1949); Process of making metallic naphthenates and soaps; US Patent 2466925
- 101) **Gélvez, L.** (sin fecha); El manganeso en la nutrición del animal; Mundo Pecuario (3 pp); https://mundo-pecuario.com/tema69/microminerales_nutricion_animal/manganeso-444.html (consultado el 2 jun 2019); El cobalto en la nutrición del animal; Mundo Pecuario (3pp); https://mundo-pecuario.com/tema69/microminerales_nutricion_animal/cobalto-437.html (consultado el 20 May 2019)
- 102) **Ciria, J.C.**; Villanueva Marín, R.; García de la Torre, J.C. (2005); Avances en nutrición animal en ganado bovino; IX Seminario de Pastos y Forrajes. 2005: 50-69
- 103) **Henderson, R.W.** (1994); Glucosamine, condroitin and manganese composition for the protection and repair of connective tissue; US Patent 5364 845
- 104) **USDA (2002); Proteinated and chelated mineral complexes; CFNP TAP Review (29 pages)**
- 105) **Molybdenum (Univ. of Wyoming; Extension Dept.): 21- 24; www.uwyo.edu/uwe/pubs/b1183/_files/molybdenum.pdf**
- 106) **Mitchell., P.C.H.** (2007); Int. Molybdenum Assoc., IMO: Overview of Environmental Database;; Overview (2 pages); [https:// web.archive.org/web/20070516181602/http://www.hse.imoa.info/Default.asp?page=110](https://web.archive.org/web/20070516181602/http://www.hse.imoa.info/Default.asp?page=110)
- 107) **Zarczynska, K.**; Sobiech, P.; Rekawek, W. (2013); Effects of selenium on animal health; J. Elem. s: 329- 340; doi: 10.5601/jelem.2013.18.2.12
- 108) **Hefnawy, A.E.G.**; Tórtora-Pérez, J.L. (2010); The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health; Small Ruminant Res. 89 (2-3): 185-

- 192; doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.19.042
- 109) Frelek, J.**; Geiger, M.; Voelter, W. (1999); Transition metal complexes as auxiliary chromophores in chiroptical studies on carbohydrates; *Current Organic Chemistry* 3(2): 117-146
- 110) Chinese Patent Application CN 102321004 A (2012); Method for synthesizing L-(+)- selenomethionine**
- 111) Tarafder, M.T.H.**; Khan, A.R. (1993); Peroxo complexes of molybdenum (VI), uranium (VI), zirconium (IV) and thorium (IV) ions containing some amino acids; *Indian J. Chem.* 32A: 781- 784
- 112) Hsu, H.J.** (1996); Metal amino acid chelate; US Patent 5504055
- 113) Djordjevic, C.**; Vuletik, N.; Bradley, A.; Lee Renslo, M. et al. (1997); Molybdenum (VI) peroxo α -amino acid complexes: synthesis, spectra and properties of $\text{MoO}(\text{O}_2) 2(\alpha\text{-aa})(\text{H}_2\text{O})$ for $\alpha\text{-aa}$ = glycine, alanine, proline, valine, leucine, asparagine, glutamine and glutamic acid. X-ray crystal structures of the glycine, alanine and proline compounds; *Inorg. Chem* 36 (9): 1798- 1805; doi: 10.1021/ic9610997
- 114) Mancka, M.** (2006); Vanadium and molybdenum complexes with amino acid functionalized ligands; Thesis (Dr. Rer. Nat.), Friedrich-Schiller Universität, Jena; www.db-thueringen.de/sevrllets/MCRFileNodeServlet/dbt_derivate_00010067/Mancka/Dissertation.pdf
- 115) Budiasih, K.S.**; Anwar, Ch.; Santosa, S.J.; Ismail, H. (2013); Molybdenum complexes with amino acids as antihyperglycemic agent: preparation and spectroscopic studies; The II International Conference of Indonesian Chemical Society, 2013; Kogyakarta, Indonesia 22- 23 October 2013.
- 116) Jensen, N.L.** (1976); Enzymatically prepared metal proteinates; US Patent 3969540.
- 117) Korhola, M.**; Edelmann, K. (1986); Yeast preparations enriched with trace elements; *Acta Pharmacol. et Toxicol.* 59 (s7): 148-151; doi: 10.1111/j.1600-0073.1986.tb02729.x
- 118) Demirci, A.**; Pometto, A.L.; Cox, D.J. (1999); Enhanced organically bound selenium yeast production by fed- batch fermentation; *J. Agric. Food Chem.* 47(6):2496- 2500
- 119) Esmacili, S.**; Khosravi-Darani, K.; Pourahmed, R.; Komeili, R. (2012); An experimental design for production of selenium-enriched yeast; *World Applied Sci. J.* 19 (1): 31- 37; doi: 10.5829/idosi.wasj.2012.19.01.2634
- 120) Rajashree, K.**; Muthukumar, T. (2013); Selection of culture medium and conditions for the production of selenium enriched *Saccharomyces cerevisiae*; *African J. Biotechnol.* 12 (20): 2972- 2977; doi: 10.5897/AJB2012.11207
- 121) Rajashree, K.**; Muthukumar, T. (2013); Preparation of organic selenium yeast by fed-batch fermentation; *Int. J. Food Ferment. Technol.* 3(2): 135- 142; doi: 10.5958/2277-9396.2014.00341.9

- 122) **Nisamedtinov, I.** (2007); Selenium yeast production: a fully controlled fermentation process; Lallemand's International Selenium Yeast Seminar (Grenaa, Denmark, 2007); <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/selenium-yeast-production-t33983.htm> (downloaded on 28 Jun 2019)
- 123) **Díaz, V.B.** (2018); Oligosacarinas (Oligosacáridos); Producción Química y Aplicación a los Cultivos Vegetales (Edit. Autores de Argentina; ISBN 978-987-761-465-7): 69- 79; www.victorbautistadiazquimico.com
- 124) **Chinese Patent CN 101942399 B (2012)**, Molybdenum-enriched *Saccharomyces cerevisiae* and application thereof.
- 125) **EFSA Scientific Opinion (2009)**, Inability to assess the safety of molybdenum-enriched yeast added for nutrition purposes as a source of molybdenum in food supplements and the bioavailability of molybdenum from this source, based on the supporting dossier (Question No EFSA- Q- 2005- 203); EFSA Journal 1087: 1-6
- 126) **Pal, D.T.**; Gowda, N.K.S. (2015); Organic trace minerals for improving livestock production; Broadening Horizons 17; Feedipedia, Animal Feed Resources Information System (5 pages); www.feedipedia.org/content/organic-trace-minerals-improving-livestock-production (downloaded on 9 Jun 2019)
- 127) **Budiasih, K.S.**; Anwar, Ch.; Santosa, S.J.; Ismail, H. (2013); Synthesis and characterization of chromium (III) complexes with L-glutamic acid, glycine and L-cysteine; Int. J. Biotechnol. Bioeng. 7(6): 458- 462
- 128) **Mufarregue, D.J.** (2007); El yodo en la ganadería; Noticias y Comentarios (Ediciones INTA) 419 83 páginas)
- 129) **Sánchez, J. Ml.** (1995); El yodo en la nutrición del ganado bovino; nutrición Animal Tropical 2 (1): 95- 120
- 130) **Szabo, J.L.**; Hill, D.; Bruce, W.F. (1956); Diamines and salts thereof; US Patent 2739981

TÓPICO 4

**Bentonitas y sus aplicaciones
en la Industria Bioquímica**

4.1) Objeto del estudio e introducción

En las industrias química y bioquímica habitualmente se emplean métodos y procesos que no ocupan un lugar central en las investigaciones científicas del momento, no son enseñados en los cursos universitarios y van siendo olvidados o directamente ignorados por los profesionales egresados. Tal el caso de las hidroxipatitas en el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos o el empleo de la cristalización *in situ* del ácido benzoico en el seno de una solución acuosa de polipéptidos, que pueden ser hormonales: la hormona resulta atrapada dentro del cristal de ácido benzoico en forma cuantitativa, aislándolas del seno acuoso por simple filtración de los cristales; el caso de las bentonitas y su empleo en la Industria Bioquímica está comprendido dentro de este proceso, que parece generalizado. En la opinión del autor, esto es lamentable, pues con estos métodos se pueden lograr avances en el aislamiento y purificación de moléculas de interés con sencillez, practicidad y costos muy reducidos, antes de recurrir a técnicas sofisticadas que serán usadas posteriormente para una refinación óptima del producto en cuestión. Esto es particularmente interesante dentro del campo de la Bioquímica Farmacéutica, en donde se obtienen productos naturales o biotecnológicos de alto valor agregado y que habitualmente tienen que ser aislados de caldos o extractos en donde se encuentran presentes en concentraciones mínimas. El objeto de esta contribución es rescatar el uso y utilidad de las bentonitas en la Industria Bioquímica, induciendo al profesional que se desempeña en áreas de desarrollos y estudios químicos industriales a pensar en la posible aplicación de estos criterios (que no se limitan a las bentonitas). En principio, este documento opera también como una revisión histórico-bibliográfica del tema, de manera de facilitar la profundización de estos aspectos al estudiante o profesional interesado en estos conceptos.

4.1.1) Química, Geología y usos de las bentonitas. Breve descripción

Las arcillas son mezclas de sustancias originadas por la disgregación (meteorización) de rocas ígneas (silíceas) que contienen feldespato en su composición. La meteorización, fenómeno debido a la actividad de los agentes atmosféricos (presencia de dióxido

de carbono, agua a diferente temperatura y presión, transcurso de las eras geológicas) permite que se libere potasio y parte de la sílice del feldespato con formación de un silicato de aluminio hidratado. Dado que en este proceso es fundamental la acción del agua y del dióxido de carbono, estas reacciones son denominadas *hidrotermales* y cuando la roca que sufre esta transformación es feldespato “puro”, el producto de reacción hidrotérmica es el caolín, también denominado *arcilla de China* por su color casi blanco. En la reacción hidrotermal se produce carbonato de potasio, habitualmente utilizado como fuente espontánea de K por los vegetales del lugar de descomposición. La arcilla así formada se estaciona *in situ* o es arrastrada por la fuente de agua y depositada en otros sitios, que bien pueden ser la costa de lagos y lagunas. Estas arcillas (silicato de aluminio hidratado) están naturalmente acompañadas de otros minerales u óxidos metálicos (fundamentalmente óxido de hierro), además de arenisca, carbonato y sulfato de calcio y de magnesio, materiales micáceos, etc. (1) (2) (3). Si la reacción hidrotermal produce sustancias del tipo caolín por haber actuado sobre feldespatos potásicos ($6\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{K}_2\text{O}$), esta reacción suele denominarse de “caolinización”, con producción de sílice y KHCO_3 , además del caolín, así denominado por poseer un contenido de caolinita superior al 80% ($2\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). La caolinita es un material pulverulento, de color blanco o blanco marfil (pero puede admitir tonos rosados y verdosos, por la ya expuesto), de densidad aproximada 2,6-2,7, blando con una dureza en la escala de Mohs de 2-2,5, que cristaliza en el sistema monoclinico y también triclinico (3)(4). Por el contrario, la *montmorillonita* es el mineral arcilloso predominante en la bentonita (ceniza volcánica alterada). Bentonita, entonces, es la arcilla que contiene más de 80% de montmorillonita. Es una arcilla plástica y tiene la propiedad de absorber agua produciendo el fenómeno de hinchamiento. La montmorillonita puede representarse por la estructura $6\text{SiO}_2 \cdot 3\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3)(4). Su forma cristalina es monoclinica, su densidad comprendida entre 2-3 y es mucho más blanda que la caolinita. En este punto, obsérvese que la montmorillonita contiene iones sodio (también de K, Mg, Ca), que son intercambiables, mientras que la caolinita no tiene capacidad de intercambio, a excepción del ión HO^- . En su conjunto, las arcillas pueden ser de estructura fibrosa o laminar (filosilicatos); estos filosilicatos son minerales en general de baja dureza y densidad, conformados por láminas que pueden sufrir el fenómeno de exfoliación. Tal efecto deriva del predominio de capas de Si-O de extensión indefinida, en donde particularmente 3 de cada 4 O de cada tetraedro de SiO_4 están compartidos con los tetraedros vecinos, en relación Si:O igual a 2:5 (4)(7). De manera que, en su estructura cristalina, tales arcillas contienen sílice tetrahédrico y alúmina octahédrica, unidas entre sí formando láminas o capas de octaedros y tetraedros. Se dice que un empaquetamiento es bilaminar o de tipo 1:1 cuando existen láminas tetrahédricas y octaédricas alternadas; es de tipo trilaminar o 2:1 cuando una lámina octaédrica está comprendida entre dos tetrahédricas y de tipo 2:2 cuando existen 2 láminas tetrahédricas y 2 láminas octaédricas, y tanto la caolinita como la montmorillonita comparten la disposición 1:1 (5). En la

montmorillonita, la fuerza de enlace entre láminas es lábil, por lo que admite la inclusión de gran cantidad de moléculas de agua entre sus láminas. De aquí que las arcillas montmorilloníticas (bentonitas) sean muy plásticas, de muy alta superficie específica (200-300 m²/g), en donde cada partícula presenta una superficie y una estructura laminar de naturaleza aniónica, cuya electroneutralidad se logra por la presencia intercambiable de Na⁺ y Ca⁺⁺ (menos frecuentemente, K⁺) dispuestos interlaminarmente; estos cationes pueden entonces ser reemplazados por otros iones o por sustancias orgánicas de tipo catiónico (6), y es precisamente esta disposición catiónica y su alta superficie específica lo que confiere a la bentonita su capacidad de intercambio iónico, su poder adsorbente, su capacidad de absorción de agua (incrementando su volumen hasta en 20 veces) y la formación de suspensiones acuosas de comportamiento tixotrópico. El grado de división o tamaño de partícula citado es muy importante, a tal punto que se ha definido a la arcilla como una roca sedimentaria cuyo tamaño de grano es inferior a 2 micrometros (7). Acorde con lo expuesto, todos los filosilicatos pueden considerarse arcillas si poseen un tamaño de grano que no supere los 2 micrometros; el Al y el Mg son predominantes en la estructura octaédrica, y como se ha dicho, tienen la propiedad de exfoliación en forma paralela a las láminas (7). La montmorillonita presenta una mayor superficie específica que la caolinita (cuyo valor alcanza los 50 m²/g) y lo mismo sucede con la capacidad de intercambio catiónico: en la caolinita es de 3-5 meq/100g, mientras que la montmorillonita trepa al valor de 80-200 meq/g (7). La capacidad de adsorción es una consecuencia de la superficie específica de las bentonitas y de la presencia de centros activos en la superficie del grano e interláminas. Las bentonitas sódicas son mucho más hinchables que las cálcicas, las cuales presentan un hinchamiento moderado. Las denominadas *tierras de Fuller* o *tierras de batán* son bentonitas cálcicas no hinchables y son sumamente útiles en el campo de la decoloración de aceites vegetales debido a su extraordinaria capacidad de adsorción de pigmentos carotenoides (7) (8). Para la decoloración del aceite de palma y otros aceites fuertemente coloreados, es conveniente tratar la bentonita con HCl o H₂SO₄ en caliente, con lo cual se aumenta su superficie específica lo que amplifica varias veces su capacidad de retención de pigmentos y hace menor la cantidad necesaria del decolorante: se logran así reducciones del índice de color (Lovibond) de aprox. 100 veces (8). De manera que las tierras de Fuller son bentonitas ácidas, en donde el calcio fue reemplazado total o parcialmente por H⁺. En Argentina se produce bentonita fundamentalmente en las provincias de San Juan (La Elcha S.A.) y Río Negro, utilizadas sobre todo en la extracción de petróleo y en la fabricación de materiales cerámicos, y a tal fin fueron estudiadas analítica y tecnológicamente a través de ensayos de aptitud normalizados (9). El análisis químico de las arcillas, y por tanto de las bentonitas, comprende técnicas volumétricas de complejometría y espectrofotometría UV-Vis y de llama, a través de marchas analíticas bien conocidas y detalladas (5)(6)(9)(10). En la actualidad, parece haber consenso en tomar como definición para la bentonita, aquella proporcionada por R. Grim en el año 1962

(9)(11): *bentonita es una arcilla compuesta esencialmente por minerales del grupo de las es-mectitas, con independencia de génesis y modo de aparición*. La denominación “bentonitas” que se les dá a estas arcillas, se debe a razones históricas: en el año 1888 fueron descubiertos en Fort Benton, Wyoming (EEUU) estos minerales con características notables, tales como la del hinchamiento en agua y la formación de suspensiones geloides que presentaban el fenómeno de tixotropía. Su amplia diversidad de características ha estimulado su estudio científico y técnico para su aplicación en operaciones industriales de diversa índole (12). Excluyendo su empleo en la Industria Bioquímica, las bentonitas se utilizan en los procesos de fundición de metales, extracción de petróleo, materiales cerámicos, ingeniería civil, construcciones, industria jabonera, etc. También se emplean en la industria farmacéutica, purificación de efluentes y en la fabricación de alimentos para seres humanos y animales (5)(6)(7)(8)(12)(13).

En la **Industria Farmacéutica** su uso fundamental es como adsorbente y para proporcionar viscosidad a soluciones y suspensiones de uso tópico, aunque también pueden ser incluidas en formulaciones orales; a tal fin las bentonitas están monografiadas en las farmacopeas más relevantes (EP, USP, JP). Un uso interesante de las bentonitas en este campo, es la adsorción de drogas que presentan cargas positivas (cationes), generando así un medio de liberación controlada; sus usos cosméticos no son despreciables, sobre todo como emulsificante y estabilizante de suspensiones de tipo aceite en agua. La **Industria Química** utiliza las bentonitas fundamentalmente en el área de obtención de catalizadores, además de sus usos como cargas para caucho y plásticos (12). Pero sin lugar a dudas es en la preparación de catalizadores, en donde ocupan un lugar destacado (7). A tal fin, las bentonitas suelen modificarse por métodos de síntesis inorgánica introduciendo en su estructura laminar otros óxidos catalíticamente activos, tal como el TiO_2 (14). Esto es así debido a que las bentonitas ofrecen una doble función: como soporte físico y como cocatalizador, a la vez de presentar alta superficie específica, conjunción de las acideces de Bronsted-Lowry y de Lewis, y la posibilidad de ofrecer una catálisis heterogénea, lo cual permite el reciclado del catalizador, mejor separación de productos y mayor tiempo de vida del ámbito de reacción (15). De esta manera, se ha logrado polimerizar etileno (para rendir polietileno) así como también aldehídos (15). También se han empleado bentonitas modificadas con Al y Fe, Cu o Mn para la eliminación de contaminantes orgánicos en seno acuoso vía peroxidación catalítica (16). En la **preparación de alimentos y piensos para animales**, las bentonitas encuentran también común empleo. Esto es debido a que dada su gran capacidad de adsorción, elimina toxinas (aflatoxinas) que pueden estar presentes en el cereal de los gránulos o pellets: el alimento recorre el tracto digestivo en mayor tiempo, retiene mayor cantidad de agua (lo que genera que el excremento contenga menos humedad y evite la suciedad excesiva de camas, proliferación de insectos y parásitos. etc.) y actúa como ligante y soporte de aditivos tales como antibióticos, sales, vitaminas, etc. (7)(12). En la **Industria de alimentos para consumo humano**, su uso es difundido en la refinación de aceites comes-

tibles, azúcar y clarificación de vinos, cerveza y jugos de fruta. Como ya se ha expresado antes, las bentonitas bajo la forma de tierras de Fuller se emplean en el blanqueo físico de aceites vegetales, a los cuales se los trata en condiciones de baja humedad con 3% de tierra de Fuller o aún menos, habitualmente acompañado de 0,25% de carbón activado; el sistema se mantiene en agitación 20-30 minutos y los adsorbentes son separados por filtración (17)(18). La adición de arcillas bentoníticas a los jugos de caña de azúcar es una práctica difundida y antigua, propuesta ya en 1861 con fines de clarificación y abrigamiento del jugo clarificado; los ensayos se han repetido en el tiempo con distintas bentonitas y en distintas regiones geográficas obteniéndose a veces resultados contradictorios (Hawái, Puerto Rico, Cuba, Java, Sudáfrica, etc.), probablemente a causa de los diferentes orígenes de la arcilla y una deficiente normalización de las mismas: a tal fin, se ha comparado el uso de arcilla de Montana con bentonitas ácidas, bentonitas Volclay KWK, etc. (19). En la **Industria Vitivinícola** el empleo de bentonitas es un hábito firmemente establecido: proteínas inestables que pueden estar presentes en los vinos, tienden a solubilizarse produciendo turbiedad, e incluso, depósitos, fenómeno sumamente indeseable, sobre todo en la producción de vinos blancos. Este fenómeno es evitado a través de la adición de bentonitas, las cuales adsorben estos materiales proteicos, asegurando el abrigamiento de la bebida. Es verdad que esta práctica tiene aspectos colaterales adversos, tales como la captura de componentes olfativos y gustativos del vino, así como la merma producida por el hinchamiento que sufre el mineral; ello ha conducido a estimular estudios para reemplazar el uso de las bentonitas por otros materiales en teoría inertes, tales como la zirconia(20). No obstante estas dificultades reconocidas, el uso de bentonitas con estos fines se encuentra bien documentada a la fecha. Se debe tener en cuenta el suspender la cantidad adecuada de bentonita en agua caliente (40°C) bajo agitación y agregando de a pequeñas porciones para evitar grumos, adicionada a un volumen de agua 5-10 veces su peso. Se deja reposar entonces 12 hrs, eliminando el sobrenadante por decantación. La precipitación de proteínas en el vino, se denomina *quiebra proteica*, siendo las proteínas termolábiles las que tienen un peso molecular comprendido entre 15-85 kDa; las de alto peso molecular expresan valores de 40-100 kDa. En la clarificación de vinos blancos o rosados, se usan concentraciones de bentonitas de 40-80 g/Hl, a temperaturas de 15-20°C y pH bajo (21). Bentonita adicionada a 40g/Hl estabiliza la precipitación de proteínas por trazas de Cu^{++} (*quiebra cúprica*) y de Fe^{+++} , impidiendo la formación de fosfato férrico coloidal (*quiebra férrica blanca*). Las bentonitas también tienen aplicación en la fermentación de mostos blancos, en el arrastre de levaduras, permitiendo mejor sedimentación de las mismas, y en la elaboración de vinos tintos para adsorción de los pigmentos coloidales (21). Los valores de pH inferiores a 4,6 favorecen la captura de proteínas dado que permitirán que las mismas expresen carga positiva si su punto isoelectrico se ubica por sobre el valor de pH del vino (intercambio catiónico entre el Na^+ de la bentonita y el catión proteínico); sin embargo, las proteínas también son adsorbidas por participación de las

regiones polares terminales de las mismas (22)(23). Las bentonitas también encuentran aplicación en el campo del **tratamiento de efluentes y aguas residuales**, fundamentalmente en la remoción de sustancias orgánicas tales como colorantes, compuestos fenólicos, descartes de la industria farmoquímica, etc.; esto se efectúa de acuerdo a procedimientos bien estudiados y publicados en la literatura científica (24)(25)(26); de la misma manera, han sido aplicadas a la remoción de metales pesados presentes en efluentes industriales (27). Ahora bien, dado que las bentonitas son minerales presentes en la corteza terrestre, con amplia distribución geográfica y variedad geológica (lo que conlleva considerable variabilidad química y estructural), es natural pensar que, para lograr usos con resultados técnicos aceptablemente repetibles, deben ser sometidas a alguna especie de criterio de “normalización”, que permita predecir el resultado de sus aplicaciones industriales. Esto es así, y de hecho, parte de la bibliografía citada encara estos conceptos (activación) de una u otra manera, lo que será revisado a continuación.

4.2) Criterios de activación de bentonitas Bentonitas activadas

En el año 1960, Scott (28) describió uno de los primeros métodos de normalización de bentonitas destinadas a usos bioquímicos, el cual consistía en someter el mineral a etapas de lavado con soluciones de acetato y de cloruro de sodio; el método es de enorme utilidad en la preparación de polisacáridos ácidos y en la síntesis de las denominadas *bentonitas organofílicas*, lo cual fue posteriormente bien revisado (29). El proceso, también aplicable a caolines, está basado en la capacidad de intercambio catiónico de las bentonitas, permitiendo tener el mineral con alto tenor de Na^+ , por reemplazo total o parcial del calcio en la bentonita original. Esto es importante pues las bentonitas sódicas son más adsorbentes que las cálcicas, con lo cual se minimiza su consumo y las pérdidas de productos valiosos contenidos en las tortas de filtración. Dado que en general las bentonitas así tratadas son más activas que las originales, este método se ha denominado **activación sódica**, por lo menos en lo que hace a la jerga industrial. El procedimiento es sumamente sencillo y aplicable en instalaciones con montajes mínimos. La **activación ácida** supone el intercambio total o parcial de los cationes reemplazables (sean Na^+ , Ca^{++}) por H^+ , obteniéndose así una arcilla ácida. El tratamiento consiste en la suspensión de la bentonita en una solución de H_2SO_4 o HCl 2-3M durante cierto tiempo, luego del cual se lava y se filtra, procediendo a secar el sólido obtenido (5). Este tratamiento conviene hacerlo estudiando las concentraciones de ácido, la temperatura y el tiempo de contacto con la solución ácida, de manera de establecer el tratamiento que permita obtener óptimos resultados para la sustancia

en particular que se desee vincular a la bentonita y que, a la vez, garantice los adecuados consumos de ácido evitando así derroches, pérdidas económicas y contaminación ambiental indeseable. Estos tratamientos de activación tienen gran importancia en la práctica técnica porque modulan ciertas propiedades de las bentonitas para desempeñarse en determinados usos especiales (7), dado que aumentan su capacidad de intercambio iónico, se incrementa su superficie específica (generación de sílice amorfa) y se activan centros catalíticos (7). En la experiencia del autor, la utilización de HCL 2M a 80°C ha dado excelentes resultados en trabajos de adsorción, condiciones similares a las publicadas por Tuesta y colaboradores (25). El empleo de HCl tiene la ventaja que los iones cloruro se eliminan más fácilmente en las etapas de lavado que los iones sulfato, necesitándose menor número de lavados y menor tiempo. Algunos investigadores proponen el empleo de una corta activación ácida, antes del pasaje de la bentonita a fase sódica por contacto con soluciones de NaCl (27). La eliminación previa de materia orgánica (humus) presente en el mineral de partida se logra por destrucción de la misma a través de un tratamiento con H_2O_2 (27). La **activación térmica** de bentonitas suele practicarse después de una activación sódica o ácida, preferentemente sódica, y se efectúa a temperaturas moderadas que oscilan entre los 100 y los 200°C; nuevamente el técnico deberá actuar a conciencia, estableciendo la necesidad de la activación térmica para mejorar la captura basal del adsorbato deseado, esto es, sin activación térmica, y luego a distintas temperaturas y tiempos de calefacción a la temperatura determinada como óptima. La gráfica de las distintas funciones empíricas generadas por estos ensayos proporcionarán información sumamente útil (que el experto no ignora), sobre todo teniendo en cuenta que el tratamiento ácido de por sí suele disminuir sensiblemente el tamaño de la partícula de bentonita así tratada (27). La **activación mecánica** es una molienda que tiende a reducir el tamaño de partícula sensiblemente, a escala de nanómetros. Este tratamiento habitualmente no se lleva a cabo en la industria química, dado que se necesitan instalaciones características del establecimiento minero de origen, lugar en donde generalmente se lleva a cabo la micronización. La **activación de la arcilla por pilarización** o simplemente **pilarización** es un procedimiento mucho más elaborado, que emplea métodos característicos de la síntesis inorgánica y de la ciencia y tecnología de los materiales; por tal motivo, el autor prefiere remitir al lector interesado a la bibliografía de referencia, sumamente autorizada. En tal sentido, este documento se apoyará, como introducción, en la excelente publicación de Picasso y Sun Kou (30):

- La particular estructura de las arcillas derivadas de los filosilicatos, y en especial bentonita, permite reemplazar átomos de Si por otros cationes de menor carga, por ejemplo, por Al u otros cationes trivalentes. El aluminio de las estructuras octaédricas, a su vez, se puede reemplazar, como antes, por cationes de carga menor, en este caso, Mn^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} (30).
- Se genera así un exceso de carga negativa en la estructura interlamina, con lo cual

se atraen a otros cationes, tales como Na^+ , K^+ (que a su vez también serán intercambiables), o bien, moléculas polares como el agua (30).

- El proceso de pilarización convierte estas arcillas en productos de modificación sintética: la hidrólisis de sales de aluminio, cromo, zirconio, etc., genera grandes hidroxilaciones, los cuales se introducen en el espacio interlaminar, con lo cual lo separan, ampliando el espacio natural interlaminar (30). Un posterior proceso de calcinación consolida estos encajes oxihidroximetálicos (*pilares*) impidiendo el colapso de la estructura pilarizada. El producto final es la arcilla o bentonita pilarizada (PILC por sus siglas en inglés). Además de los cationes polioxihidroximetálicos, los agentes de pilarización pueden ser de distinta naturaleza, tal como por ejemplo, amonios cuaternarios o quelatos metálicos. Dada la inestabilidad térmica de estas sustancias pilarizantes, en la actualidad el empleo de cationes oxihidroxilados (muchas veces de naturaleza polimérica) resulta de elección (30). Naturalmente, este proceso sintético depende de las condiciones de reacción para rendir productos más o menos adecuados para los usos a los cuales se los desea destinar, pero en todo caso aumenta el área específica, la porosidad de la partícula (lo que conlleva un aumento de la tortuosidad interlaminar) y una destacable propiedad ácida de Lewis, además de la termoestabilidad (30). También se emplea, en los pasos sintéticos, el denominado *dopado* con cationes extraños, lo que permite optimizar ciertos comportamientos catalíticos.

Sun Kou (31) ha ensayado con éxito este tipo de bentonitas modificadas, aplicándolas a la decoloración de aceites para eliminar de esta forma, carotenoides y pigmentos relacionados, confirmando las excelentes propiedades de adsorción que poseen estas bentonitas “semisintéticas”. Las bentonitas pilarizadas son utilizadas como catalizadores en la industria petroquímica y también en el tratamiento de aguas residuales, como catalizadores de procesos foto-Fenton y otros procedimientos similares (16) (32). La aplicación como adsorbente de las denominadas **bentonitas organofílicas** encuentra utilidad en la industria bioquímica, no solo en procesos de decoloración sino en métodos de eliminación de amonios cuaternarios indeseables en líquidos de extracción biológica. Las bentonitas organofílicas son el producto de reacción de la bentonita, adecuadamente purificada de otros minerales, con compuestos cuaternarios de amonio, idealmente aquellos que poseen una cadena parafínica. El proceso en sí está basado en el intercambio iónico del ión inorgánico, por ejemplo, Na^+ , por el voluminoso catión orgánico que expone una cadena grasa, lo que confiere un carácter organofílico (hidrófobo) a la partícula de bentonita, la cual, antes del intercambio, era de naturaleza hidrofílica; esta nueva propiedad adquirida la hace dispersable en solventes orgánicos: esto estimula su capacidad de “disolver” superficialmente moléculas orgánicas, a la vez que se pronuncia la tortuosidad interlaminar de la partícula (33). Este proceso es conocido, por lo menos, desde la década de 1950, y permite obtener

sustancias sumamente útiles en gran diversidad de procesos industriales, incluidos sus usos cosméticos y farmacéuticos. Se debe hacer notar que a estas bentonitas se las suele denominar *bentonas* en la jerga industrial, pero esta denominación es confusa, pues con el término “bentona” también suelen designarse a las grasas industriales que contienen bentonitas organofílicas (34). Naturalmente, en la unión del amonio cuaternario a la arcilla, no sólo interviene el intercambio iónico, sino el fenómeno de adsorción tal cual. Es interesante lo expuesto por Kozac et al (35) cuando hace referencia a que si bien este fenómeno es de largo tiempo conocido, no ha sido, sin embargo, objeto de interés por parte de muchos investigadores; el presente autor cree además (por lo menos de acuerdo a su experiencia) que muchos menos autores se han ocupado de la utilidad de las bentonitas organofílicas en la Industria Bioquímica. La síntesis de estas interesantes organoarcillas es sencilla y básicamente consiste en poner en contacto suspensiones de bentonita con soluciones acuosas del amonio cuaternario de cadena alifática, posterior filtrado y lavado para eliminar iones inorgánicos y orgánicos y posterior secado a temperatura moderada (35). Es notable que, en función de la concentración del compuesto catiónico, se puede establecer una segunda atmósfera de tal sustancia, rodeando la partícula de bentonita: la primera capa está formada por el tensioactivo catiónico vinculado a la arcilla por intercambio catiónico/adsorción. La segunda capa está conformada por moléculas del detergente catiónico cuya cadena alifática se asocia por hidrofobicidad a la cadena grasa de la primera (35). Sorprendentemente, también se han preparado organobentonitas a partir de tensioactivos no iónicos: Shen (36) ha estudiado en detalle estas preparaciones, facilitando sus métodos de síntesis así como su caracterización exhaustiva. El surfactante no iónico (fundamentalmente polioxietilenados) se introduce interlaminairementemente, desarrollándose fuerzas de adsorción aún más fuertes que con los tensioactivos catiónicos: en ausencia de grupos iónicos, los enlaces de hidrógeno y la atracción electrostática son considerados los autores de tal adsorción, cuya intensidad se logra a través de un balance entre la parte hidrocarbonada y la cadena polioxietilénica del tensioactivo (36). La preparación se logra poniendo en contacto la bentonita con el cuerpo no iónico a temperatura ambiente durante 24 hrs en agitación y posterior lavado del organomineral para eliminar aceptablemente restos del tensioactivo. Los ensayos de adsorción demuestran una vinculación más fuerte del tensioactivo no iónico que la correspondiente a los amonios cuaternarios (36); en todo caso, la preparación de ambos tipos de organobentonitas es suficientemente sencilla como para ser practicada a escala industrial. Se obtienen así productos hidrofóbicos insolubles aptos, una vez secos, para ser utilizados en distintos procesos de adsorción (37). En 1983, Jones (38) introduce el interesante concepto de *activador polar* para organobentonitas destinadas a ser usadas en medios orgánicos: es necesaria la presencia en el medio de pequeñas cantidades de moléculas polares, y si las mismas no están espontáneamente presentes, se deben adicionar las cantidades requeridas de alguna sustancia polar, característicamente, metanol o acetona. En todo caso, el efecto notable de las bentonitas organofílicas es que

desarrollan una adsorción preferencial por las sustancias orgánicas disueltas en medios acuosos y no acuosos. Si la sustancia orgánica a adsorber es polar (por ejemplo, fenol) debe tenerse en cuenta que la adsorción será debida a una asociación de fuerzas de atracción (Van der Waals) entre la porción polar del adsorbato y las cadenas parafinicas del tensioactivo, pero también entre los grupos polares del adsorbato y los sitios hidrofílicos expuestos por la bentonita, que no fueron ocupados por el amonio cuaternario. Pero por otra parte, conforme se “tapiza” más uniformemente la superficie mineral con el tensioactivo, menos lugar tendrá la asociación de carácter polar entre el adsorbato y el mineral propiamente dicho, lo que originará una pérdida del valor adsorbente. En este fenómeno, también interviene la longitud de la cadena alifática del surfactante. De manera que la adsorción máxima dependerá del balance entre ambos tipos de superficie de la partícula, una hidrofóbica y otra hidrofílica (39). Se han preparado gran diversidad de bentonitas organofílicas, con procedimientos bien detallados en la bibliografía de referencia, con distintos compuestos de amonio cuaternario y con diferentes tipos de bentonita de distinta procedencia geográfica (40). En la industria, las bentonitas organofílicas encuentran amplia aplicación en la fabricación de pinturas, grasas lubricantes, tintas, tratamiento de aguas residuales, cosmética, farmacotecnia (vehículo de liberación prolongada de principios activos), recubrimientos poliméricos, etc. (7)(16)(24)(40), cuya descripción escapa al contenido de esta contribución.

4.3) Aplicaciones de los distintos tipos de bentonita en la Industria Bioquímica

La Industria Bioquímica es aquella que se especializa en la producción de productos biológicos y bioquímicos finos, de alto valor agregado, generalmente principios activos de uso farmacéutico, dermocosmético, veterinario y nutracéutico. Sin embargo, el lector puede advertir que en ninguna de las 40 referencias bibliográficas proporcionadas hasta este punto, se menciona el uso de bentonitas en este campo de la Técnica. Por tanto, se intentará en lo que sigue presentar un detalle de aplicaciones en el área citada, así como poner en relieve las diferentes ventajas que aportan en cada caso, los diferentes tipos de bentonita anteriormente descriptos. Y es precisamente desde el principio, en donde debe entenderse que, en la industria bioquímica, las aplicaciones industriales de estas arcillas son de dos tipos, sea para capturar el producto deseado y eluirlo posteriormente con fines de recuperación, o bien para capturar impurezas y purificar así el producto crudo que no será adsorbido. Como siempre, el autor aclara que los ejemplos presentados no son excluyentes ni abarcativos, y las referencias bibliográficas presentadas, aunque relevantes, no son exhaustivas.

4.3.1) Pigmentos y colorantes naturales

4.3.1.1) Carotenoides y Clorofilas:

los carotenoides forman una familia de compuestos coloreados, sintetizados por hongos, algas, bacterias y vegetales superiores, en número de varios cientos. Los carotenoides están estructuralmente vinculados al licopeno (colorante del tomate) y en su gran mayoría son hidrocarburos poliénicos de 40 carbonos unidos entre sí de manera tal que se establece conjugación, y de allí su naturaleza coloreada. Los carotenoides están conformados por dos clases de sustancias, los **carotenos** (en el caso de ser verdaderamente hidrocarbonados con exclusión de heteroátomos) y las **xantofilas** (cuando son derivados oxigenados, sea el oxígeno de naturaleza alcohólica o cetónica) (41). Entre los carotenos, se encuentran el citado licopeno y el beta-caroteno, importante por su actividad provitamina A, mientras que entre las xantofilas (derivados oxigenados) se encuentran la luteína, bixina, capxantina, zeaxantina, cantaxantina, astaxantina, etc. (41) (42). Como regla general, los carotenos (solubles en lípidos) son extraídos del material vegetal con solventes orgánicos, cuya posterior evaporación y recuperación rinde una mezcla oleorresinosa que contiene, por ejemplo, clorofila, esteroides, ceras, y el pigmento carotenoides objeto de la extracción. De tal mezcla, la sustancia deseada deberá a su vez ser extraída y purificada. Mortensen (42) brinda una excelente revisión bibliográfica sobre estructura molecular, origen, aplicaciones, distribución tisular y métodos de extracción de carotenoides, así como de otros pigmentos vegetales y de procedencia animal (por ejemplo, carmín de cochinilla). Los pigmentos microbianos también han merecido detalladas investigaciones científicas y técnicas; Joshi et al. (43) presentan al respecto una detallada revisión bibliográfica, cuyos puntos fundamentales al objeto del presente documento, se detallan, a saber:

- En general, los microorganismos que producen pigmentos son susceptibles de ser cultivados a escala técnica, permitiendo la producción industrial de estos valiosos colorantes. Entre esos microorganismos se encuentran algas microscópicas, hongos, bacterias y levaduras.
- Los factores que influyen en la producción de pigmentos son pH, temperatura, fuentes de C y de N, presencia y tipo de minerales y el método de fermentación. Estos pigmentos microbianos son, a su vez, sensibles a la luz, calor, aire, actividad del agua y pH.
- Se presentan detallados esquemas de los métodos de producción de tales pigmentos.

La presencia de carotenoides en microorganismos, en particular levaduras, es de largo tiempo conocida (44) y en base a esto se ha profundizado en el estudio de los mecanismos biosintéticos que permitan obtener estos valiosos pigmentos carotenoides (45)(46)(47), y aunque no se han ahorrado esfuerzos para lograr eficientes síntesis orgánicas de estos pigmentos (48), el método preferido al estado del arte es la

obtención de los mismos a partir de fuentes naturales. El interesante pigmento **Astaxantina**, por ejemplo, es una xantofila ampliamente utilizada para el otorgamiento del color rosado característico a salmónidos y crustáceos cultivados en cautiverio, en donde actúa como factor de crecimiento del animal, expresa fuerte actividad antioxidante y es fuente de vitamina A (41) con potenciales beneficios para los seres humanos; se la obtiene fundamentalmente de cultivos del alga de agua dulce *Haematococcus pluvialis* en fotobiorreactores, aunque también es producida a partir de otras fuentes, tales como subproductos de la industrialización de crustáceos, en donde se la encuentra en pequeñas concentraciones (inferiores a 1000 ppm) (41). Fabregas et al. (49) han optimizado la composición del medio de cultivo de *H. pluvialis*, con especial foco en el tipo de sales minerales y microelementos esenciales para su desarrollo, optimizando las tecnologías de obtención de Astaxantina. Otros autores (50) desarrollaron modelos matemáticos que vinculan la tasa de alimentación y el aporte de nitratos al medio de cultivo, con la producción de biomasa. Si Astaxantina se extrae de subproductos de la industrialización de crustáceos para consumo humano, así como la fermentación del microalga citada, es donde cobran importancia métodos de adsorción y desorción eficientes, y en este sentido se han ideado novedosas alternativas compatibles con el medio ambiente, tales como la recuperación de este pigmento de las aguas de procesamiento de crustáceos por métodos de adsorción utilizando descartes de escamas de pescado (51). Sin embargo, nada impide el ensayo y estudio del comportamiento de las bentonitas con estas aplicaciones.

Las **clorofilas** son los pigmentos verdes de los vegetales (fundamentalmente hojas y tallos), que pertenecen al grupo de las porfirinas, y que se encuentran en su estado natural, formando una mezcla de dos sustancias, la *clorofila a* y la *clorofila b*. La clorofila *a* posee un grupo metilo en el anillo pirrólico II que es sustituido por $-CHO$ en la clorofila *b*. Los miembros relevantes dentro de la familia de las porfirinas son el hemo (pigmento rojo de la sangre y grupo prostético de la hemoglobina) y la clorofila (52) (53). En los vegetales, los colorantes están unidos a proteínas (52) aunque anteriormente se pensaba que la clorofila se encontraba libre tal cual en la Naturaleza, a diferencia del hemo, vinculado a la globina conformando así la hemoglobina (54). Siendo organosoluble, la clorofila se extrae del material vegetal a través del uso de solventes orgánicos para rendir un residuo semisólido que contiene 10-20% de clorofila acompañada de otros carotenoides. Especial cuidado debe tenerse en el proceso, pues el átomo de magnesio central de la porfirina es lábil, y su pérdida conduce a la obtención de un pigmento marrón (feofitina) (42). Por tal motivo, encuentra la clorofila poca aplicación industrial como colorante, y ello condujo a la síntesis de compuestos más estables (Cu-clorofila, Cu-clorofilina) (42). Característicamente, la clorofila se extrae a partir de hojas verdes (pasto, alfalfa, verduras, etc.) por triturado del material vegetal y posterior extracción con solventes orgánicos o hidroorgánicos (por ejemplo, acetona al 80% en agua) hasta agotamiento. El extracto privado de todo resto vegetal se concentra por

evaporación a presión reducida obteniéndose un producto crudo ya descrito, a partir del cual se obtiene la clorofila (55). En otras modalidades, se emplea acetona pura, la cual, luego de la extracción, se diluye con éter de petróleo (p. eb. 30-60°C), se filtra y lava adecuadamente con agua, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro y se evapora casi hasta sequedad a presión reducida procediendo luego a su separación por métodos de cromatografía líquida en columna (56). Se han desarrollado otras tecnologías de obtención de clorofila a partir de microalgas cultivadas en efluentes de la industria pesquera o agroindustriales. Romero López et al. (57) proceden a reemplazar la acetona por etanol en la extracción de la biomasa cultivada y aislada por centrifugación, obteniendo excelentes rendimientos además de la ventaja que supone el reemplazo de la acetona por etanol, mucho más compatible fisiológicamente en el caso que en el producto final persistan trazas de solvente. Streit y col. (58) han desarrollado recientemente un interesante método de producción de clorofila-a a partir de microalgas cultivadas en efluentes de la industrialización de productos lácteos, con el logro de una espectacular conversión de los contaminantes presentes (96,9%); la extracción de la biomasa se efectúa con acetona hasta agotamiento y el extracto líquido se fracciona con una mezcla de dietiléter-éter de petróleo (1+1), procediendo a su evaporación final a bajas temperaturas; se establecieron también los parámetros críticos para el óptimo rendimiento del alga (58). Los carotenoides, por otra parte, se obtienen preferentemente como subproductos de la purificación de otros materiales, característicamente, aceites vegetales o animales (pescado). Astaxantina y luteína son extraídos del aceite de ciertos pescados (jibia, brema) adsorbiéndolos sobre carbón activado o mejor sobre mezclas adecuadas de carbón activado y bentonitas (59). Un proceso sumamente actual (60) produce carotenoides (beta-caroteno, luteína) a partir del aceite producido como subproducto de la fermentación de materiales amiláceos, en particular, derivados de la producción de etanol. Notablemente, los carotenoides contenidos en tal aceite son extraídos fácilmente vía adsorción sobre bentonitas, de las cuales se desorben a través del uso de solventes tales como acetona, etanol, hexano, solventes clorados, etc., con especial énfasis en el uso de solventes compatibles con los requisitos farmacéuticos y /o alimentarios (hexano, ter-butil metil éter). Esta ejemplar patente (60) brinda detalles técnicos sumamente ilustrativos, que con seguridad el experto sabrá aplicar a otros campos, tanto como su creatividad lo permita. En lo que sigue, se revisará el uso de bentonita como adsorbente y aún como relleno cromatográfico para cromatografía líquida en columna (bentonitas ácidas, tierras de Fuller) para estos fines, hechos bien conocidos y descritos (61). Ya sea que se trate de eliminar carotenoides y clorofilas de un producto en el cual actúan como impurezas (por ejemplo, aceites) o con el objeto de producir estos pigmentos obteniéndolos de mezclas más complejas, los criterios fundamentales sobre los que descansa esta operatoria son:

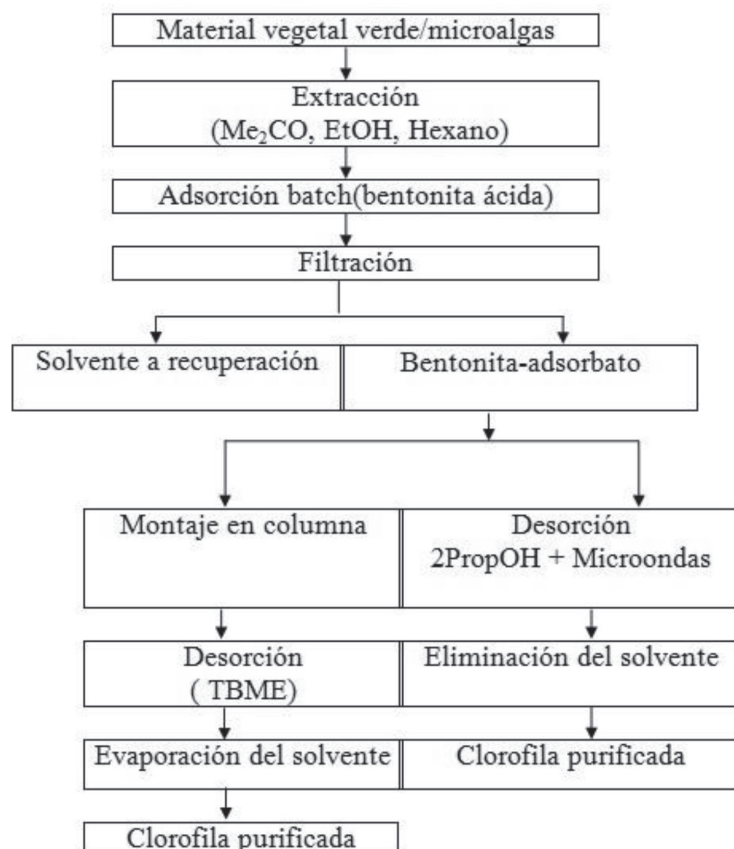
- La capacidad de las bentonitas de conservar actividad de adsorción o intercambio iónico aún en el seno de lípidos, solventes orgánicos y agua.

- La posibilidad de desorción casi cuantitativa de estos pigmentos adsorbidos en la bentonita.

La actividad adsorbente de la bentonita, y en particular de las bentonitas ácidas es conocida desde hace varias décadas (61) y repetidamente confirmada en el curso del tiempo; Guler et al. (62) adsorben clorofila de sus soluciones hexánicas, fenómeno basado en la interacción del pigmento con los sitios ácidos del mineral; González Pradas et al. (63) demuestran conclusivamente las ventajas del uso de bentonitas ácidas respecto del mineral sin activar, en la captura de clorofila a partir de sus soluciones acetónicas. La bibliografía científica y técnica es extensa en registros de estos fenómenos y se encuentra ampliamente disponible; más aún, se ha demostrado que la clorofila adsorbida a bentonita es marcadamente fotoestable respecto de la clorofila tal cual (64), lo cual brinda un excelente criterio de aislamiento de clorofilas, por ser seguro y protector del pigmento. Los métodos característicos de desorción de carotenoides fueron indudablemente desplegados por Englert y Milos (60), bibliografía discutida anteriormente y aplicable a clorofilas, aunque también se han desarrollado métodos basados en la desorción del caroteno adsorbido sobre bentonita ácida, vía irradiación con microondas en solución isopropanólica (65). Tanto el proceso de adsorción como el de desorción pueden rastrearse rápida y sencillamente a través de métodos de cromatografía en capa fina (TLC). Clorofilas a y b así como carotenoides pueden ser cromatografiados utilizando éter de petróleo/acetona (6+1)v/v sobre capas de DEAE-celulosa + celulosa microcristalina en proporción 2:15 (66); Stahl (67) brinda una enorme variedad de posibilidades, tanto en lo relativo a soportes como a eluyentes de corrida, facilitando la adaptación a cada caso particular acorde al criterio del experto; de la misma forma, el entendido en el arte percibirá claramente que solventes de corrida tales como los que se encuentran citados en la bibliografía recientemente discutida, se pueden utilizar con éxito para la elución secuencial de los adsorbatos directamente a partir de las bentonitas que los llevan adsorbidos. Ahora bien, se debe decir nuevamente que una de las primeras aplicaciones industriales relacionadas a procesos en la Bioquímica Industrial, ha sido la utilización de las bentonitas sobre aceites y grasas comestibles (17)(18)(19) y este interés no ha decaído con el transcurso del tiempo, a punto tal que permanentemente se actualizan estudios al respecto, facilitando la comprensión del efecto decolorante y su correspondiente optimización. Se examinaron bentonitas procedentes de diferentes orígenes sobre aceites prototipo, preparados con agregados conocidos de carotenos y clorofila químicamente puros (68), comprobándose que, en general, carotenoides son más eficientemente adsorbidos que las clorofilas, de acuerdo a las condiciones de temperatura, tipo de bentonita, forma de adición de las mismas al aceite y tiempos de contacto. El estudio sobre aceite prototipo también se ha extendido al ensayo de bentonitas cálcicas activadas con ácido, estableciéndose modelos matemáticos entre más de 30 combinaciones de factores que influyen en el proceso de adsorción (69), incluidas

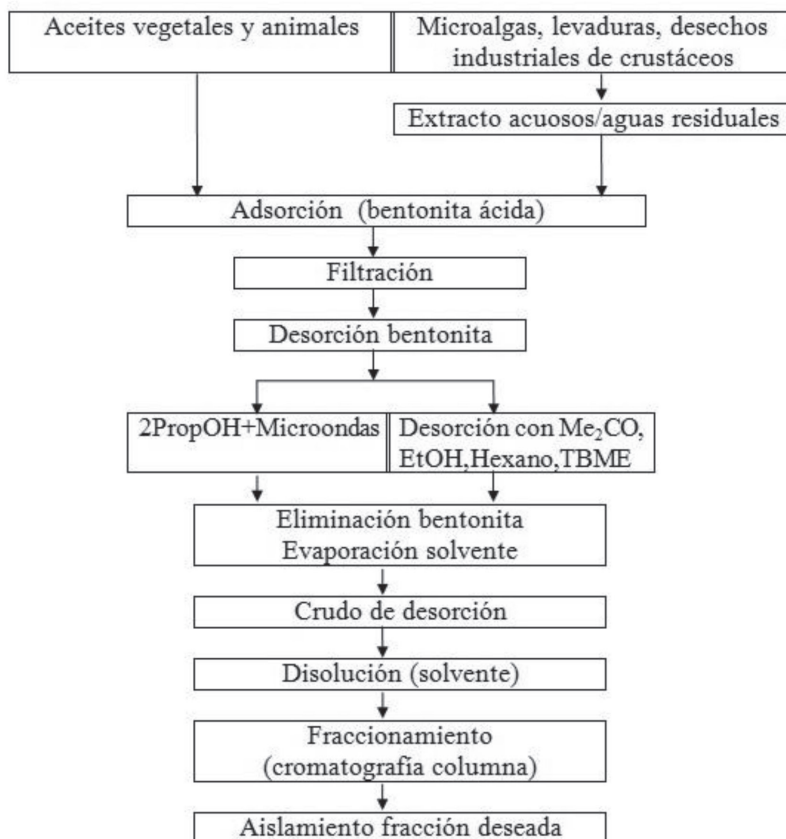
las formas de tratamiento ácido de la bentonita, concentración y tipo de ácido, tiempos de tratamiento, temperaturas, etc. (70)(71)(72)(73)(74); los estudios se han extendido también a la adsorción de carotenos y clorofila de sus soluciones en solventes puros (75), lo que brinda buenas bases para su purificación, si ése fuera el objeto. En la refinación de los jugos crudos de la caña de azúcar, el uso de bentonita es bien conocido y ya fué discutido (19); sin embargo, recientemente se ha comprobado que la adición de gelatina (20ppm) a 100°C junto con la bentonita (1,5g/l; pH4,5) mejora en forma óptima el proceso de purificación (76). En un interesante estudio, poco convencional por otra parte pero sumamente ilustrativo, Hardyanti et al. (77) estudian la comparación de bentonita y zeolita en el proceso de purificación del aceite de patchouli; la coloración de este aceite esencial es promovida por la presencia de trazas de hierro (incorporado al proceso por trabajos realizados en condiciones subóptimas) así como también por trazas de Mn^{++} , Cu^{++} y Zn^{++} , demostrando que en el proceso de adsorción, las bentonitas son más efectivas que las zeolitas mostrando un poder adsorbente mayor con menos pérdida del contenido en alcoholes característicos del aceite de patchouli. El fenómeno está influenciado por factores múltiples ya citados, la relación Si/Al, tamaño y distribución de poro, superficie específica, etc. En este punto, debe prestarse especial atención a las diferencias existentes entre bentonitas y zeolitas, muchas veces consideradas similares, en forma errónea: como ya se ha visto, las bentonitas pertenecen al grupo de los filosilicatos, desplegando estructuras laminares. Por su parte, las zeolitas, aunque son aluminosilicatos, no son laminares sino que están conformadas por una red rígida tetrahédrica de aluminio y silicio que permite la existencia de poros y/o canales, lo que les confiere la propiedad de se tamices moleculares. Mumpton (78) define las zeolitas como *"un aluminosilicato hidratado de cationes alcalinos y alcalinotérreos, teniendo una estructura tridimensional abierta, infinita..."*; *"las grandes cavidades estructurales y los canales de entrada conducen a que contengan agua en su interior, la cual forma esferas de hidratación alrededor de los cationes intercambiables: Por remoción del agua por calefacción a 350–400°C, pequeñas moléculas pueden pasar por los canales pero las más grandes son excluidas"*. La capacidad de intercambio catiónico de una zeolita sigue una función del tenor de aluminio en la red, mayor cuanto mayor sea la relación Al/Si; es así que las zeolitas pueden duplicar la capacidad de intercambio catiónico de las bentonitas. Si bien no son bentonitas, pueden coexistir en la Naturaleza con la montmorillonita, así como con cuarzo, calcita, etc. (78). Las zeolitas, naturalmente, encuentran amplia aplicación como adsorbentes, por ejemplo, en la eliminación de colorantes indeseables en la preparación de glucósidos de origen vegetal (79). Sin embargo, nada impediría utilizar bentonitas con el mismo fin, previa evaluación de cada caso particular de su comportamiento versus zeolita, tal como el efectuado en (77). Los siguientes gráficos pretenden sugerir rutas de obtención, aislamiento y purificación de sustancias carotenoides y clorofilas, a partir de referencias bibliográficas citadas al pie de cada figura:

**Gráfico 4.1 : Obtención de clorofila vía bentonitas:
Esquema tentativo**



Me₂CO: acetona; EtOH: etanol; TBME: Ter-butil metil éter; 2propOH: isopropanol

Fuente: Elaboración propia, en base a referencias (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65)

Gráfico 4.2: Obtención de carotenoides vía bentonitas: Esquema tentativo

Me₂CO: acetona; ETOH: etanol; TBME: Ter-butil metil éter; 2propOH: isopropanol

Fuente: Elaboración propia en base a referencias (42) (43) (60) (68) (69) (70)

4.3.1.2) Hemocromógenos y hemoglobina.

Debido a su afinidad por las bases nitrogenadas, el grupo hemo puede combinarse con las mismas, dando lugar a las sustancias denominadas *hemocromógenos*. Tales bases nitrogenadas pueden ser el amoníaco, aminas primarias, piridina y sus derivados (imidazol, piperidina, histidina, etc.) y por tanto el hemo puede combinarse con proteínas desnaturalizadas en donde tales bases resulten estéricamente accesibles; este fenómeno incluye la posibilidad de que una molécula de hemo se combine con dos bases nitrogenadas distintas, y tal afinidad del hemo es muy alta para el caso de la globina desnaturalizada (globina que proviene de la hemoglobina que se ha desvinculado del hemo

por desnaturalización u otros fenómenos, por ejemplo, tratamientos a pH inferiores a valores 3-4) (80); la generación de estos compuestos ha sido investigada y utilizada para el desarrollo de ensayos toxicológicos y médico-legales, no sólo para la comprobación de la presencia de sangre, sino como interesantes determinaciones de la existencia de hemocromógenos en sí mismos (81), lo que trasciende el campo de la Química Legal, haciéndolos aplicables a comprobaciones analíticas en la industria bioquímica. En la preparación industrial de hemoderivados, ya sean éstos derivados de plasma humano como de plasma animal utilizados en Medicina Veterinaria (por ejemplo, preparación de sueros hiperinmunes), la presencia de cuerpos coloreados (habitualmente trazas de hemoglobina y/o hemocromógenos) es totalmente indeseable. Los distintos procesos de obtención de seroalbúmina humana (HSA) así como de seroalbúmina bovina (BSA), culminan con un proceso de pasteurización de la solución acuosa de la proteína en presencia de estabilizadores (caprilato sódico, ácido ascórbico, acetiltryptofano). Durante la pasteurización habitualmente suceden cambios de color (del amarillo claro al amarillo verdoso) debido a la oxidación de trazas de hemoglobina para formar *verdoglobina*, cambio de coloración que, precisamente, se ha evitado por la presencia de ácido ascórbico (0,24g/en una solución de HSA al 4%) (83)(84). Es verdad que el problema ha sido eficientemente solucionado a través de la remoción de hemoglobina y sus colorantes relacionados a través de elegantes métodos cromatográficos (84). El proceso puede rastrearse a través del descenso de la absorbancia a 403 nm de una solución de HSA 1% p/v (84), o más específicamente, determinando las absorbancias de una dilución de HSA al 1% p/v, a 370, 412 y 500 nm, y aplicando la siguiente fórmula, acorde con (85):

$$\text{Hemoglobina (g/l)} = 0,14286 (A_{412} - 0,6769 A_{370} - 0,3230 A_{500})$$

Pero es innegable que los procesos cromatográficos con resinas sofisticadas tienen un costo extra que, según el hemoderivado que se trate, no siempre es soportable. Tal el caso de la purificación de hemoglobina y hemocromógenos en las preparaciones de BSA o de inmunoglobulinas animales para uso veterinario. Más aún, el problema se complica a la hora de recuperar proteínas plasmáticas de concentrados de glóbulos rojos (*paquete globular rojo o eritrocitario*) generados por la centrifugación inicial de sangre humana o animal para la obtención de plasma. La masa globular roja lleva consigo cantidades no despreciables de plasma sin separar que es susceptible de ser recuperado lavando la masa celular con solución salina y posterior re-centrifugación. Esto habitualmente genera una hemólisis adicional, generando la presencia de hemoglobina y hemocromógenos en concentraciones inaceptables. El problema se hace visible también cuando se pretende recuperar el plasma presente en bolsas de eritrocitos concentrados para uso humano, fuera de su fecha de vencimiento, para lo cual se han desarrollado métodos basados en el fraccionamiento del plasma o de las citadas recuperaciones a

través del uso de etanol y calor (86). El problema de estos indeseables efectos de coloración por la presencia de trazas de hemoglobina y hemocromógenos no pertenecen sólo al ámbito de la preparación industrial de hemoderivados. Tal el caso de la decoloración de hidrolizados proteicos (algunos de ellos, refractarios a la decoloración), como en el caso de extractos de placenta humana, la preparación de proteínas plasmáticas contenidas en la sangre placentaria o de soluciones de péptidos provenientes de la hidrólisis enzimática de ovarios de salmón (también denominada *placenta oceánica*) (87). Sin embargo, dado que la hemoglobina se adsorbe satisfactoriamente a la bentonita (88), su uso puede aportar una solución sencilla al problema expuesto, y de hecho, se puede aplicar para la eliminación de hemocromógenos presentes en soluciones concentradas de BSA antes de su pasteurización. Puede objetarse que, dependiendo de la cantidad de bentonita utilizada, las pérdidas de rendimiento asociada a la captura de proteínas plasmáticas a decolorar puede ser significativa, máxime teniendo en cuenta que la desorción de macromoléculas no siempre es satisfactoria, debido a su atrapamiento entre las láminas que conforman la bentonita. El problema ha sido resuelto brillantemente por Ralla et al. (89) utilizando un nuevo tipo de bentonita conformada fundamentalmente por bentonita y sílice amorfa natural, con la particularidad que la montmorillonita ha perdido casi por completo su estructura laminar, con lo cual la intercalación de proteínas entre las láminas es altamente improbable. Esta disposición estructural impide el hinchamiento en agua, por lo cual el mineral resulta apto para la cromatografía en columna. Variedad de proteínas pueden así ser adsorbidas y desorbidas posteriormente (incluyendo hemoglobina) en forma diferencial ajustando las condiciones del proceso (fuerza iónica, pH, flujo en el caso de empleo como relleno de columnas, etc.) Este descubrimiento significa un enorme avance en la utilización de estas bentonitas en la Industria Bioquímica, expandiendo su uso antes limitado al empleo en batch y facilitando la recuperación de las proteínas adsorbidas a través de la elución con buffers específicos para cada caso (89). Las bentonitas también pueden aplicarse a la eliminación de trazas de hemocromógenos en las últimas etapas de refinación (*"pulido"*) en la preparación de algunos polisacáridos ácidos de origen animal de interés farmacéutico.

4.3.2) Polipéptidos, enzimas y hormonas.

Hasta este punto, se ha visto que la adsorción de péptidos y proteínas por parte de bentonitas, es un hecho bien conocido y estudiado, el cual depende de la naturaleza de los cationes metálicos interlaminares (esto es, que sean alcalinos o alcalinotérreos), el pH de adsorción, la temperatura, la capacidad de intercambio iónico, etc. Se conoce también que la adsorción es tanto superficial como interlaminar, vale decir, el péptido o la proteína se incluye entre los citados espacios interlaminares, y por tanto, proteínas como la BSA tienden a sufrir desnaturalización en este proceso (90); la desorción tam-

bién tiene sus compromisos y debe ser estudiada para cada caso en particular. Sin embargo, debe tenerse presente que la bentonita no solamente es útil para el aislamiento del producto deseado, sino también para privarlo de impurezas indeseables, las cuales no necesitan ser desorbidas. Algunos ejemplos ya han sido citados (véase al respecto 4.1.1). Se presentan a continuación algunos casos de aplicación de bentonitas en la preparación de ciertos péptidos y proteínas, sin que esto signifique que los mismos tengan un carácter excluyente ni abarcativo.

4.3.2.1) Caso del Citocromo c (Cyt-c).

El Cyt-c forma parte de un complejo grupo de proteínas cuya función es la transferencia de electrones, actuando secuencialmente en tal transferencia, desde las flavoproteínas al oxígeno molecular. Todos los citocromos tienen grupos prostéticos, y tales grupos son de naturaleza ferroporfirínica (hemos), comunes también a la catalasa y peroxidasa. Por tanto, en base a su carácter de transferencia electrónica, los citocromos admiten una forma oxidada y una reducida: cada uno de ellos, en su forma reducida, muestra tres máximos de absorción en el espectro visible, que son característicos y que se denominan *bandas de Soret*, sean α , β y γ : según su configuración espectral, se encuentran tres tipos principales de citocromos, sean éstos, *a*, *b* y *c* (91); Cyt-c es una proteína de bajo peso molecular, aproximadamente 13000 Da, la cual contiene un grupo hemo por cada mol de proteína de 12000 Da. Su estructura molecular está compuesta por una sola cadena proteica de 104 aminoácidos, vinculados al grupo hemo a través de residuos de cisteína (91)(92), y fue descubierto por MacMunn en 1884 y redescubierto por D. Keilin en 1925 (91)(93). En la industria, Cyt-c se obtiene fundamentalmente a partir de corazón equino, bovino y porcino, los dos últimos en menor proporción. Reconoce varios usos, entre ellos, la preparación de productos medicinales y la fabricación de reactivos para inmunodiagnóstico. Como producto medicinal, su uso está en decadencia, aunque aún se lo comercializa en China como adyuvante en terapia de primeros auxilios en caso de intoxicación con monóxido de carbono, envenenamientos con hinóticos o cianuros, accidentes cerebrovasculares, etc. (Cytochrome c solution; Sichuan Deebio Pharmaceutical, China) (De Feier Pharm; Defeier Pharmaceutical, China) (Sai Tuo; Tianjin Bioch. Pharm.; China) (94) y también como gotas oftálmicas (Oftan- Catachrom; Santon Oy) (95). En la fabricación de reactivos para inmunodiagnóstico (western- blotting, inmunoprecipitación, tinción en ensayos de inmunofluorescencia) es producido por Biolegend® (San Diego, CF) y Biovision Inc. (CF, EEUU); Sigma-Aldrich (Merck AG) lo produce en forma purísima a partir de corazón equino y bovino, con fines de reactivo bioquímico (96); en este caso, es preparado a través del método del ácido tricloroacético (TCA), el cual será revisado en este mismo ítem. Con respecto a los métodos de producción de Cyt-c a partir de corazón equino, bovino o porcino, la revisión bibliográfica revela su obtención a partir de tres métodos, a saber:

- El método del sulfato de aluminio, o método de Margoliash y colaboradores (1967).
- El método del ácido tricloroacético (TCA).
- El método del ácido acético.

En el primer caso, Cyt-c se extrae del órgano finamente molido con una solución acuosa de sulfato de aluminio ajustada a pH 4,5 (recuérdese la capacidad coagulante que poseen los cationes respecto de los coloides tales como las proteínas, mayor cuanto mayor sea la valencia del catión y el peso molecular de la proteína). El tejido molido se suspende en 2-8 partes en volumen de solución de sulfato de aluminio 0,5% y la mezcla se pasa a través de un molino coloidal: El magma resultante se ajusta a pH 4,5 con agregado de sulfato de aluminio y se mantiene en agitación ocasional a temperatura ambiente por no menos de 2 horas. Se procede a filtrar adecuadamente, y el líquido aceptablemente límpido (que lleva el Cyt-c en solución) se ajusta a pH 8,0-8,5 (2-4°C) con NH_4OH , con lo cual el catión Al^{+++} precipita como hidróxido. Una nueva filtración elimina el $\text{Al}(\text{OH})_3$ permitiendo obtener una solución rojo brillante, con la cual se alimenta una columna cromatográfica cuyo relleno es una resina de intercambio catiónico débil, quedando retenido el Cyt-c en su forma reducida. La captura del citocromo también puede ser efectuada adicionando la resina en batch. El Cyt-c es eluido de la resina por pasaje de NaCl 0,5M ajustado a pH 8-8,5. El eluato se oxida con la mínima cantidad de ferricianuro de potasio y agregado de sulfato de amonio hasta lograr el 80% de saturación: El precipitado se aísla por filtración y se dializa versus agua destilada conteniendo 0,2-0,3 g/l de fosfato disódico. En otra modalidad, el Cyt-c se eluye de la resina con solución de sulfato de amonio al 5% (pH 8,5) y el eluato se precipita, como antes, adicionando sulfato de amonio csp 80% de saturación. Nuevamente, se aísla este precipitado el cual se purifica finamente a través de dos etapas consecuentes de cromatografía y posterior elución, diálisis y secado por liofilización (97)(98).

Los otros dos métodos, sean el del TCA y el del ácido acético, son conceptualmente similares, y reposan en el criterio de la desnaturalización/precipitación del grueso de las proteínas, permaneciendo el Cyt-c en solución, a partir de la cual se lo aísla y refina. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que ambos métodos no son iguales: mientras que el método del TCA puede reducir la cantidad de superóxidodismutasa (SOD) presente, tiende a causar dimerización del citocromo o introducir alteraciones estructurales mediadas por el tipo de acidez. El método del ácido acético, por el contrario, puede dejar un mayor tenor de SOD pero una menor proporción de citocromo dímero (96). En el método del TCA, el corazón equino molido se extrae con 1 volumen de solución 0,13-0,15M de TCA durante 3 horas a 5°C, luego de lo cual se filtra hasta grado de brillantez, y el líquido se ajusta a pH 7 con NaOH diluido. Como en el caso del sulfato de aluminio, se captura el Cyt-c sobre resina de intercambio catiónico débil adicionada en batch. La resina con el Cyt-c adsorbido se aísla fácilmente, el líquido se descarta y

el Cyt-c se eluye de la resina en columna con acetato de amonio 0,5M, a lo que sigue una concentración por UF y diafiltración versus NH_4OH 0,005M. El líquido retenido se descarga del ultrafiltro y liofiliza, obteniéndose un producto semi-crudo, el cual se refina acorde a los métodos presentados en (97).

En el procedimiento del ácido acético, el corazón equino finamente molido se extrae con 2 vols. de ácido acético 0,5M durante 3 horas a 5°C. Transcurrido el plazo se ajusta a pH= 7 con hidróxido de amonio y se abandona durante toda la noche a 5°C con agitación ocasional. Se procede entonces a su filtración hasta la obtención de un líquido brillante, con el cual se prosigue según los métodos enseñados en (97)(98). En otras modificaciones de estos métodos, se usa como acidulante ácido sulfúrico en lugar de TCA o de ácido acético, o bien adicionando al extracto obtenido 500g/l de sulfato de amonio, con lo cual precipitan variedad de impurezas que se eliminan por filtración. Al líquido brillante así obtenido se le adiciona 50g/l de sulfato de amonio, y el Cyt-c es precipitado por adición de TCA 20%. El precipitado rojo se lava con solución saturada de sulfato de amonio, se disuelve en NaCl 0,5% y se diafiltra versus dicha solución hasta eliminación total de sulfato. El retentato dializado se precipita con exceso de acetona (5 vols.) y el precipitado aislado se disuelve en solución concentrada y se liofiliza (98)(99). En todos los métodos presentados y sus variaciones es importante que el órgano sea inmediatamente desprovisto de sangre contenida, con la aorta seccionada y desgrasado a cuchilla, antes de ser congelado para su posterior industrialización. La lectura de las referencias bibliográficas aportará detalles de utilidad al técnico estudioso. En base a lo expuesto, es fácil pensar que Cyt-c puede ser adsorbido por bentonitas, acorde a los mecanismos ya expuestos. La adsorción de Cyt-c sobre monoláminas de montmorillonita ha sido estudiada como una forma novedosa de introducción de Cyt-c en células vivas vía fagocitosis (100). En este trabajo, nuevamente se demuestra la dependencia del fenómeno de adsorción respecto de la concentración de proteína. El moderno desarrollo de tamices moleculares mesoporosos ha traído como consecuencia importantes avances en los procesos industriales de preparación de Cyt-c. Un tamiz molecular mesoporoso es un material cuyo diámetro de poro (relativamente uniforme) está comprendido entre 2-50 nm, lo que en muchos casos los hacen aptos como rellenos para cromatografía en columna. En el terreno que se está tratando, la adsorción de Cyt-c sobre tamices moleculares mesoporosos (sintetizados a partir de zeolitas o materiales arcillosos naturales o bien directamente a partir de SiO_2 puro) está bien documentada (101)(102)(103)(104), y de tales documentos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los factores determinantes en la adsorción de Cyt-c sobre estos materiales (al igual que con las bentonitas) son el pH del medio, el mayor o menor contenido de Al (a mayor tenor de Al, mayor adsorción), la concentración de proteína, la salinidad del medio, el elevado punto isoeléctrico del Cyt-c ($\text{pI}= 9,8$), el diámetro de poro, etc.

- No se han encontrado diferencias significativas en la tasa de adsorción de Cyt-c sobre tales materiales entre los diámetros de poro comprendidos entre los 3 y los 9 nm.
- La adsorción de efectúa preferentemente a valores de pH cercanos al punto isoelectrico del Cyt-c.
- La adsorción (sobre todo cuando el adsorbato se obtiene con fines industriales) se efectúa mejor sobre materiales mesoporosos extrudados, por ejemplo, en forma cilíndrica, de manera que su uso resulte fácilmente manejable. En estos extrudados, la bentonita natural participa activamente actuando como ligante acompañada, por ejemplo, de metil celulosa y agua.
- A pH superiores al pI, la adsorción de Cyt-c experimenta un descenso.
- La adsorción no depende sólo del diámetro, sino también del volumen del poro.
- La adsorción de Cyt-c utilizando distintos valores de pH, buffers y otras condiciones (tiempos, temperaturas) es siempre escasa, lo que parece no configurar un método de aislamiento de Cyt-c, pero sí de inmovilización del mismo (por ejemplo, útiles como rellenos en cromatografías de afinidad).

4.3.2.2) Caso de la urokinasa (UK).

La urokinasa (UK) es una enzima producida en el riñón de hombres y animales mamíferos. Se la denomina también urokinasa-activador del plasminógeno (uPA) debido a la actividad que posee sobre el plasminógeno transformándolo en plasmina activa, la cual actúa estimulando el proceso denominado *fibrinólisis*. De allí su actividad terapéutica para la disolución de coágulos (embolia pulmonar, coágulos en el corazón y extremidades inferiores, etc.) y por eso mismo, su obtención presenta fuerte interés industrial; dado que la vida media de UK *in vivo* es muy corta, puede haber recidivas coagulatorias, y por tanto habitualmente se administra junto con heparina. Por tal motivo, es un fármaco trombolítico (aunque también se lo prepara con fines de reactivo bioquímico) (105).

Este enzima de tipo serinoproteasa (tripsinosimilar) fue descubierta en 1947 (106). Posteriormente, Nobuhara et al. (107) encuentran en la orina humana, dos formas de urokinasa, sean de alto peso molecular (HMWUK por sus siglas en inglés) y de bajo peso molecular (LMWUK), la primera presentando un peso molecular de 51.600 Da y la segunda, de 34.500 Da. Ambas están compuestas por dos cadenas polipeptídicas enlazadas entre sí por enlaces disulfuro. El peso molecular de la cadena pesada en ambas formas, es el mismo (34.000 Da), pero el peso molecular de la cadena liviana es de 17.600 Da en HMWUK y de 1200- 3400 Da en LMWUK (107). UK de orina humana utilizada con fines bioquímicos no farmacéuticos, tiene un peso molecular de 54.000 Da (108). En la actualidad, se la obtiene mayormente a partir de orina humana con fines industriales, pero también por cultivo de líneas celulares de riñón humano, aunque el peso molecular de sus distintas formas es diferente a la obtenida de orina

humana. Hasta el año 2007, no parecen haberse desarrollado métodos económicamente eficientes para la producción industrial de UK vía criterios biotecnológicos (109), pero en la actualidad su producción industrial descansa en ambos métodos, de orina humana (Urokinasa Vedim; UCB Pharma; Madrid) y de líneas de cultivo celular (KinlyticTM, urokinase for injection; LMWUK, MW 32.000 Da). En todo caso, UK de orina humana está compuesta por un 85% de HMWUK y 15% de LMWUK, con un peso molecular combinado de aprox. 50 kDa (110), pero más específicamente, con un peso molecular de aprox. 31.000 Da para la fracción LMWUK y aprox. 55.000 Da para HMWUK (111). Se revisarán a continuación los métodos de producción de UK a partir de orina humana. Se debe aclarar que esta orina proviene de varones jóvenes sometidos a stress físico (entrenamiento fuerte) por lo que tradicionalmente se ha elegido a instalaciones militares (cuarteles, regimientos) para la recolección de orina, lo cual no sólo presenta la ventaja citada, sino la posibilidad de contar con un gran número de donantes en lugares centralizados, lo que facilita la rapidez de la recolección y procesamiento inmediato. La recolección de orina se efectúa en bidones instalados en los cuarteles o dependencias militares, conteniendo timol en cantidad suficiente para lograr una concentración final (a bidón lleno) de 2 g/l. Como se verá, conceptualmente UK es aislada de la orina de hombres jóvenes a través de métodos de adsorción. En 1961, Singher y Zuckerman (112) presentan un ingenioso y muy útil método de captura de UK, haciendo cristalizar ácido benzoico en el seno de la orina, presente inicialmente en la misma como benzoato de sodio (el que a su vez, actúa como preservativo microbiano): por ajuste de la orina así preparada a pH 3,0-4,5, precipitan los cristales de ácido benzoico los cuales llevan UK atrapada en el seno cristalino o adsorbida en su superficie, dejando la orina prácticamente privada de actividad urokinásica. El ácido benzoico se filtra fácilmente y posteriormente se disuelve en acetona, con lo cual el enzima cruda se obtiene como un flóculo; el flóculo se disuelve en buffer adecuado y se purifica a través de columna de intercambio iónico (carboxílica), de la cual se eluye secuencialmente con NaCl 0,5M. El método, sumamente elegante, permite la obtención de UK suficientemente pura para ser usada con fines farmacéuticos. Conviene puntualizar que la orina materia prima, debe ser colada a través de un tamiz de malla fina para la retención de imperfecciones groseras (colas de cigarrillos, pelos, etc.) y no filtrada a través de ayuda filtrante, pues en ese caso, el producto activo quedará adsorbido sobre el material que forma la precapa. Aunque el método anteriormente detallado no es exactamente de adsorción, en esa fecha ya se conocían otros adsorbentes tales como sulfato de bario o fosfato de calcio. Sin embargo, fueron rápidamente reemplazados por el uso de silicatos intercambiadores de cationes (caolín, zeolitas) o bien por silicagel (SiO₂) (113). La adsorción se lleva a cabo preferentemente en batch a valores de pH 3-7 en la orina. El sólido se separa del líquido por filtración y se eluye a pH 8-11 (preferentemente pH 10) con solución de amoníaco diluido al 4%. La fracción que contiene UK se somete a un proceso de readsorción, elución y fraccionamiento con el agregado de sales preci-

pitantes, tales como NaCl (csp 20%, pH 1,5) o sulfato de amonio. El uso de bentonita como adsorbente de UK es introducido por A. Lesuk (114), el cual adsorbe UK sobre bentonita adicionada en batch sobre la orina, de la cual es fácilmente aislada y separada de la orina, que se descarta. La bentonita con la UK adsorbida se eluye a pH ácido con solución de diamino etoxiacridina (la cual puede ser reemplazada por eluyentes orgánicos menos contaminantes y más fáciles de eliminar). UK se obtiene del eluato así obtenido por precipitación salina, la cual se somete a otras etapas de purificación hasta la obtención de UK cristalizada. N.H. Sloane fue un prolífico inventor que ha desarrollado múltiples métodos de captura, elución y purificación de UK a partir de orina de varones jóvenes. Para ello, aprovecha la capacidad que posee el ácido tánico de precipitar proteínas, y en una serie de sucesivas patentes utiliza el criterio en forma notable; de tal cuerpo patentario pueden resaltarse los siguientes lineamientos fundamentales (115)(116)(117)(118), a saber:

- El ácido tánico, agregado en solución hidroalcohólica a la orina, precipita el complejo con UK y otras proteínas. El precipitado aislado se redissuelve en buffer Tris-HCl pH 7,4 y alcalinizado a pH 10 por goteo de NaOH 0,2M, con lo cual se libera UK y el ácido tánico forma la sal sódica, la cual se elimina por diálisis junto con pigmentos y otras impurezas.
- El retentado de la diafiltración es tratado a 0°C con butanol helado, agitando suavemente. UK permanece en solución mientras que otras proteínas resultan desnaturizadas y se agrupan en forma de gel que sobrenada y es descartado. La solución acuosa se purifica de butanol a través de un nuevo paso de diafiltración, dializando versus buffer Tris-HCl.
- Un nuevo paso de refinado de la UK que proviene de los procesos que usan ácido tánico está basado en la adición de EDTA csp 0.005-0,05M (pH 7,4) y posterior adición de DEAE-celulosa: la UK no es adsorbida mientras que sí lo son las impurezas proteicas y colorantes urinarios. En otra modalidad, bajando la concentración de EDTA por debajo de 0,0025M, UK será adsorbida por la DEAE-celulosa, dejando en solución impurezas proteicas y colorantes, solución que se descarta. Por incremento de la concentración de EDTA a pH 7,4, UK eluye fácilmente de la celulosa, en forma purificada.
- El fenómeno de adsorción/complejamiento de UK llevado a cabo con ácido tánico, se puede realizar también reemplazando el ácido por un aducto formado entre el ácido tánico y nucleoproteínas (nucleoproteinato).

Independientemente de lo expuesto, Sloane extiende el criterio de la captura de UK con ácido benzoico, al ácido úrico. El ácido úrico en polvo se adiciona a la orina y se agita, permitiendo la adsorción de la UK. El sólido se aísla, descartando la orina sin actividad biológica, y se disuelve en solución ligeramente alcalina. El urato así formado se elimina en un posterior paso de diálisis (119). Sin embargo, la adsorción de UK con-

tenida en orina se hace preferencialmente sobre matrices silíceas, ya sean éstas naturales (tal como las bentonitas) o sintéticas. De hecho, Novak (120) presenta una ejemplar patente sobre el tema, utilizando como adsorbentes minerales SiO_2 y/o TiO_2 , puros, o bien arcillas caolínicas. En su método, el citado autor propone los siguientes pasos:

- Adsorción de la UK presente en la orina (pH 4,5-5,5) con el adsorbente (0,25-0,50g/l, 30 minutos de agitación suave). Recolección del sólido y descarte de la orina agotada.
- Lavado del sólido con agua para la remoción de pigmentos y proteínas no adsorbidas. El eluato se descarta.
- El sólido así lavado se eluye con buffer 0,05M pH 10,4 (0-5°C), se ajusta a pH 10,0 y se agrega cantidad suficiente de sulfato de amonio para lograr 30% de saturación (incluyendo en la medida del volumen, la sílice que está en suspensión, eluyéndose) y el pH se reajusta a 10,0.
- Se separa el adsorbente utilizado (a descarte o recicló) y el eluato conteniendo el total de la UK se ajusta con sulfato de amonio a 40-50% de saturación. Se deja precipitar a 0-5°C durante toda la noche y se recoje el precipitado.

El sedimento se suspende en Tris 0,05M pH 10,4 y el insoluble (proteínas extrañas) se descarta. Se desciende el pH 2,0 con HCl, con lo cual vuelven a precipitar más proteínas extrañas insolubles a ese pH. El precipitado se descarta y la solución se lleva a pH 4,5-5,0 dejando que precipite UK, la cual se redisuelve en buffer Tris.

- La solución buffer conteniendo UK se diafiltra versus buffer Tris pH 7,5 para eliminar pigmentos, sales inorgánicas y oligopéptidos extraños (el presente autor sugiere una membrana de UF cut-off 10 kDa).
- Purificación final de la UK por cromatografía de intercambio iónico/permeación en gel, nuevo paso de diafiltración y acondicionado final (depirogenado por filtración a través de placa depirogenante (por ejemplo, ZetaPlus®).

También se han efectuado estudios para la captura y elución de UK contenida en orina a través de métodos basados en cromatografía de afinidad. Se han desarrollado procesos que utilizan como ligando el polipéptido aprotinina, purificando así soluciones de UK “cruda” que proviene de la elución de adsorbentes tales como silicatos, bentonitas y caolín, con los cuales se trató la orina de partida: para ello se utiliza aprotinina soportada químicamente sobre Sepharose® (121). El mismo criterio de afinidad ha sido descripto aplicado al aislamiento y purificación de UK contenida en el caldo de cultivos celulares que la contienen (aunque nada impediría ensayar con estos métodos su captura en orina). En este caso, la resina de afinidad está compuesta por un material silíceo (polvo de vidrio, silicagel) el cual lleva vinculado un polímero aniónico, como el carboxil polietileno. La UK se eluye luego de su captura con buffers tales como el constituido por acetato de sodio 0,5M, EDTA 0,005M y Tween 0,01%, a pH 7,0 (122).

4.3.3) Recuperación de compuestos de amonio cuaternario contaminantes de desechos líquidos de naturaleza biológica

Una actividad destacada dentro de la Industria Bioquímico-Farmacéutica es la obtención y purificación de polisacáridos con actividad biológica, y en particular aquellos polisacáridos ácidos que están cargados negativamente. Tal es el caso de los polisacáridos sulfatados tales como la heparina, condroitin sulfato, dermatán sulfato, y ciertos polisacáridos de origen marino o vegetal. En su aislamiento, una técnica difundida es el aislamiento del polisacárido de sus extractos, por adición de cetil trimetilamonio bromuro (CTAB) o cetil piridinio cloruro (CPC). El presente autor describe el tema con detalle en alguna de sus obras anteriores, lo que torna innecesario su repetición (123) (29) (véase 4.2 de la presente publicación). Es evidente que luego de la precipitación del carbohidrato persisten en la solución a descarte, trazas de amonio cuaternario las cuales pueden ser fácilmente removidas con el uso de bentonitas, tal como está indicado en las referencias citadas.

4.3.4) Usos Misceláneos

Los ejemplos aquí presentados demuestran la amplitud de aplicaciones técnicas que tienen estas arcillas en el campo de la Bioquímica Industrial, y se estimula al lector interesado al desarrollo de otros métodos, usos y variantes, sin duda tantos como su creatividad e interés lo permita. Adicionalmente, se presentan algunos casos concretos de esta diversidad.

Ciertos antibióticos (en particular, aquellos que presentan una estructura peptídica) son adsorbidos por las bentonitas permitiendo su aislamiento del medio de cultivo y su posterior elución. La *avoparcina* es un antibiótico glicopeptídico, que presenta un peso molecular de aprox. 1500 Da; consiste en dos cadenas glicopeptídicas (α y β) y es una sustancia soluble en agua. Comercialmente es producido por cultivo de *Streptomyces candidus* y utilizado como aditivo alimentario para estimular la producción de carne en animales destinados a consumo humano (ganado y aves de corral), ya que se comporta como promotor de crecimiento (124)(125). Efectivamente, cuando al caldo de fermentación del hongo citado, que contiene el antibiótico en solución, se le agregan cantidades adecuadas de bentonita (sódica, cálcica o ácida), el antibiótico resulta adsorbido casi cuantitativamente y es posteriormente eluido de la bentonita con agua alcalinizada con amoníaco hasta pH 10,5-10,8 (125). Los puntos fundamentales del descubrimiento de Waite (125) son:

- La captura del antibiótico puede hacerse directamente a partir del medio de cultivo del hongo conteniendo la biomasa en suspensión. El sólido se separa de la

biomasa por diferencias de densidad, aunque en otra modalidad, el caldo puede ser filtrado previamente para liberarlo de la biomasa antes de practicar la adsorción.

- La adsorción se efectúa en medio ácido, acidificando el caldo a pH 1,9-2,3 con solución de ácido sulfúrico. Adición de bentonita (30 minutos al citado pH). Separación.
- Elución del antibiótico tratando el mineral con solución acuosa amoniacal en batch (lo que simplifica la operatoria industrial al evitar la necesidad de elución en columna).
- Los eluatos reunidos contienen el antibiótico impuro, el cual se purifica por UF a través de membranas de cut-off 1500-2000 Da, lo que permite una remoción importante de pigmentos y otras impurezas.

El enzima *invertasa* producido por la levadura de cerveza (*S. cerevisiae*) puede ser aislada del medio de cultivo a través de la adsorción sobre bentonita, la cual es un excelente adsorbente de la misma. El fenómeno de adsorción está influido por las condiciones de autólisis del microorganismo, temperatura y pH durante la captura y elución (126).

Las bentonitas también han encontrado sorprendente aplicación en la purificación de virus vegetales: ribosomas, ribonucleasas y materiales coloreados son rápidamente adsorbidos por la bentonita magnésica en buffer fosfato pH 7,4 a diferentes concentraciones de $MgSO_4$; algunos virus vegetales son adsorbidos por la arcilla, mientras que otros no lo son; más aún, todas las cepas de un mismo virus no tienen necesariamente la misma tasa de adsorción sobre bentonita magnésica; un detalle adicional muy útil es que la contaminación con ribonucleasa es eliminada, o por lo menos, fuertemente impedida (127). Por otra parte, no debe despreciarse el interesante uso que tiene las bentonitas para la inmovilización de enzimas industriales: por ejemplo, glucoisomerasa puede fijarse a bentonita y ser utilizada para la obtención de jarabe de maíz de alta fructosa (128).

Referencias bibliográficas:

- 1) Babor, J.A.; Ibarz, J. (1963); Química general Moderna (Marín y Cía.; Barcelona, VII Edición): pag 674; pag 759.
- 2) Cury, R. (1935); Merceología; Tecnología Mercantil e Industrial (F. Crespillo; Buenos Aires; 1° Edición): 325-326
- 3) Marí, E.A. (1998); Los Materiales Cerámicos (Edit. Alsina, Bs. As.; ISBN 950-553-055-2): 55-61.

- 4) **Dana, J.D.**; Hurlbut, C.S. (1959); Manual de Mineralogía (Reverté, Barcelona; II Edición): 446-461.
- 5) **Largo Castro, D.P.**; Villamarín Coral, K.M. (2013); Caracterización y activación química de arcilla tipo bentonita para su evaluación en la efectividad de remoción de fenoles presentes en aguas residuales (Tesis Final de Grado en Química Industrial; Univ. Tecnológica de Pereira, Colombia): 27-33; repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/3838/55361L322.pdf?sequence=1&isAllowed=y (consultado el 4 Sept 2019)
- 6) **Moreira Toja, R.J.** (2016); Propiedades de una bentonita industrial nacional y su caracterización estructural basada en absorción y difracción de rayos X (XANES y DRX); Trabajo Final de Grado (Univ. Nacional de La Plata); core.ac.uk/download/pdf/153567105.pdf
- 7) **García Romero, E.**; Suárez Baraios, M. (sin fecha); Las arcillas: propiedades y usos (25 pp) (Univ. Complutense de Madrid; Univ. de Salamanca); campus.usal.es/- delcien/doc/GA.PDF (consultado el 17 Ago 2019).
- 8) **Webb, F.C.** (1966); Ingeniería Bioquímica (Acribia, Zaragoza): 594-594.
- 9) **Hidalgo, N.**; Senese, A.; Cano, E.; Sarquis, P. (2016); Caracterización y evaluación de la calidad de bentonitas provenientes de las provincias de San Juan y Río Negro (Argentina) para uso en industria petrolera y cerámica; Boletín Geológico y Minero 127 (4): 791-806; doi: 10.21701/bolgeomin.127.4.003
- 10) **Delgado López, M.**; Ochoa L., R. (1989); Análisis Químico de Arcillas; Revista de Química III(2): 133-141; revistas.pucp.edu.pe>index.php>quimica>article>download
- 11) **Grim, R.E.** (1962); Applied Clay Mineralogy (McGraw-Hill, NY); 422 pages.
- 12) **QuimiNet.com (2006); Usos y aplicaciones de las bentonitas (4pp); www.quiminet.com.mx/ar5/ar_%25D44%2500%2524W%25CC.htm (consultado el 11 Dic. 2008).**
- 13) **Marí, E.A.** (1998); opus cit.: 53-104.
- 14) **Torres, J.A.**; Carriazo, J.G.; Sanabria, N.R. (2013); Síntesis y caracterización de bentonita modificada con especies de TiO₂ y Fe-TiO₂ obtenidas del mineral ilmenita; Rev. Colombiana de Química 42(1): 1-29; www.redalyc.org/articulo.oa?id=309032108007
- 15) **Tabernero, V.** (2012); Las arcillas: mucho más de lo que parece; Ecocampus (Univ. de Alcalá, España) (73 pp; Microsoft Power Point; charla arcillas para publicar).
- 16) **Galeano, L.A.** (2011); Peroxidación catalítica de contaminantes orgánicos en medio acuoso utilizando una bentonita modificada con Al y Fe, Cu o Mn; Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas (Univ. de Salamanca).
- 17) **Gini Lacorte, C.** (1945); Química Industrial; Industrias orgánicas (El Ateneo, Bs.As.; II Ed.): 13-68

- 18) **Schroeder, W.F.** (1992); “Mantecas” en “Elementos de Tecnología de Alimentos” (Desrosier, N.W. ed.; CECSA): 546-549.
- 19) **Douwes Dekker, K.** (1982); “Agentes químicos usados en la fabricación de azúcar” en “Principios de Tecnología Azucarera” (Honig, P. ed.; CECSA, México); I: 323-378.
- 20) **Salazar González, F.N.** (2008); White wine continuous protein stabilization: industrial viability; Tesis (Universitat Rovira i Virgili; ISBN 978-846-9127032); <http://hdl.handle.net/10803/8556>
- 21) **Urbina Vinos Blog (2013); Bentonitas en la clarificación del vino; urbinavinos.blogspot.com/2013/05/bentonitas-en-la-clarificacion-del-vino.html (consultado el 21 Ago 2019).**
- 22) **Blade, H., Boulton, R.** (1988), Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution; *Am. J. Enol. Vitic.* 39(3): 193-199.
- 23) **Sun, X.; Li, C.; Wu, Z.; Xu, X. and others** (2007); Adsorption of protein from model wine solution by different bentonites; *Chin. J. Chem. Eng.* 15(5): 632-638.
- 24) **Martínez Stagnaro, S.Y.** (2017); Evaluación sobre el uso de arcillas para la adsorción de colorantes utilizados en la industria textil; Tesis de Doctorado en Ingeniería (Univ. Nac. de La Plata, Argentina)
- 25) **Tuesta, E.G.; Vivas, M.; Sun, R.; Gutarra, A.** (2005); Modificación química de arcillas y su aplicación en la retención de colorantes; *Rev. Soc. Quím. Perú* 71(1): 26-36; scielo.org.pe/pdf/rsqp/v71n1/a05v71n1
- 26) **Parolo, M.E.** (2010); Minerales arcillosos de la Nor Patagonia Argentina en la retención de compuestos orgánicos que impactan sobre la salud humana y el medio ambiente; Tesis de Doctorado en Química (Univ. Nac. del Sur, Bahía Blanca, Argentina); repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/123456789/2112/1/Parolo.pdf
- 27) **Rosas, N.M. Guerrero, V.H.; Cañar, F.** (2014); Activación química de nanoarcillas y su aplicación en la remoción de metales pesados; IX Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2014: 117-122; <https://journal.espe.edu.ec/ojs/cienciaytecnologia/article/download>
- 28) **Scott, J.E.** (1960); Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues; *Methods of Biochem. Anal.* VIII: 145-197.
- 29) **Díaz, V.B.** (2016); Conversión Técnica de Proteínas; valorización de desechos proteicos (AMV Ediciones, Madrid; I Edición; ISBN 978-84-945558-3-1): 23-27.
- 30) **Picasso, G.; Sun Koi, M. del R.** (2008); Aplicaciones tecnológicas de las arcillas modificadas; *Rev. Soc. Quím. Perú* 74(1): 57-74; www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S1810-634X2008000100007 (consultado el 23 Ago 2019).
- 31) **Sun Koi, M. del R.** (1999); Modificación de arcillas naturales para su posterior uso como adsorbentes; *Rev. de Química XIII* (1): 7-16.

- 32) **Herney-Ramírez, J.**; Vicente, M.A.; Madeira, L.M. (2010); Heterogeneous photo-Fenton oxidation with pillared clay-based catalyst for waste water treatment: a review; *Applied Catalysis B: Environmental* 98: 10-26; doi: 10.1016/j.apcatb.2010.05.004
- 33) **Lazo, J.C.**; Navarro, A.E.; Sun-Koi, M.R.; Llanos, B.P. (2008); Síntesis y caracterización de arcillas organofílicas y su aplicación como adsorbentes del fenol; *Rev. Soc. Quím. Perú* 74(1): 3-19; www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S810-634X2008000100002 (consultado el 22 Ago 2019)
- 34) **www.bardhalindustria.com/bentona-bentona/**
- 35) **Kozak, M.**; Domka, L.; Skrzypczak, A. (2002); Adsorption of the quaternary ammonium salts on bentonite; *Physicochem. Problems of Mineral processing* 36: 299-306.
- 36) **Shen, Y-H.** (2001); Preparations of organobentonite using nonionic surfactant; *Chemosphere* 44: 989-995; doi: 10.1016/S0045-6535(00)00564-6
- 37) **Jordan, J.W.** (1963); Organophylic clay-base thickeners; *Proceedings of the Tenth National Conference on Clays and Clay Minerals*: 299-307.
- 38) **Jones, T.R.** (1983); The properties and uses of clays which swell in organic solvents; *Clay Minerals* 18: 399-410.
- 39) **Cowan, C.T.**; White, D. (1962); "Adsorption by organo-clay complexes" in "Clays and Clays Minerals" (Pergamon Press, NY) vol9: 459-467.
- 40) **Patel, H.A.**; Somani, R.S.; Bajaj, H.C.; Jasra, R.V. (2007); Synthesis and characterization of organic bentonite using Gujarat and Rajasthan clays; *Current Sci.* 92(7): 1004-1009
- 41) **Higuera-Ciapara, I.**; Félix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M. (2006); Astaxanthin: a review of its chemistry and applications; *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.* 46: 185-196; doi: 10.1080/10408690590957188
- 42) **Mortensen, A.** (2006); Carotenoids and other pigments as natural colorants; *Pure Appl. Chem.* 78(8): 1477-1491; doi: 10.1351/pac200678081477
- 43) **Joshi, V.K.**; Attri, D.; Bala, A.; Bushan, S. (2003); Microbial Pigments; *Indian J. Biotechnol.* 2: 362-369
- 44) **Peterson, W.J.**, Bell, T.A.; Etchells, J.L.; Smart, W.W.G. (1954); A procedure for demonstrating the presence of carotenoid pigments in yeast; *J. Bacteriol.* 67(6): 708-713
- 45) **Radulescu, G.**; Mocanu, E.; Cojocaru, I.; Damsa, F. and others (2009); Studies on biosynthetic pathways of obtaining carotenoid pigments; 16th Romanian Int. Conf. on Chem. and Chem. Eng.; Sept. 9-12, 2009; Sinaia-Romania: 8 pp.
- 46) **Canizares-Villanueva, R.O.**; Ríos-Leal, E.; Olvera-Ramírez, R.; Ponce Noyola, T. y otros (1998); Microbial sources of pigments; *Rev. Latinoam. Microbiol.* 40(1-2): 87-107.
- 47) **Boshale, P.**; Bernstein, P.S. (2005); Microbial xanthopylls; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(4): 444-455; doi: 10.1007/s00253-005-0032-8

- 48) **Choi, S.;** Koo, S. (2005); Efficient syntheses of the beta-carotenoids cantaxantin, astaxanthin and astacene; *J. Org. Chem.* 70(8): 3328-3331
- 49) **Fabregas, J.;** Domínguez, A.; Requeiro, M.; Maseda, A.; Otero, A. (2000); Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53(5): 530-535.
- 50) **Del Río, E.;** Acien, F.G.; García-Malea, M.C.; Rivas, J. y otros (2005); Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture; *Biotechnol. Bioeng.* 91 (7): 808-815.
- 51) **Stepnowsky, P.;** Olafsson, G.; Helgason, H.; Jastorff, B. (2004); Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste; *Chemosphere* 54(3): 413-417.
- 52) **Fieser, L.F.;** Fieser, M. (1966); *Química Orgánica Superior* (Grijalbo S.A.; Barcelona-México); I: 919-924
- 53) **Gutsche, C.D.;** Pasto, D.J. (1979); *Fundamentos de Química Orgánica* (Reverté S.A., Barcelona; ISBN 44-291-7475-3 obra completa); II: 1091-1092.
- 54) **Giral, F.** (1946); *Productos Químicos y Farmacéuticos* (Atlante, México D.F.); III: 1775-1776.
- 55) **Ruiz Santiago, F.L.;** Ruiz Velázquez, J.A.; Hernández Becerra, J.A.; García Jiménez, R. y otros (2019); Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco; *Inv. Des. Ciencia y Tecnol. De Alimentos* 4: 891-896.
- 56) **Brieger, G.** (1970); *Química Orgánica Moderna; Curso Práctico de Laboratorio* (Harper and Row Inc.; ISBN 06-3100609): 57-58.
- 57) **Romero-López, T.;** Echeverría Lazo, H. (1998); Concentración de clorofila total en el extracto etanólico procedente de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera; *Boletín del Centro de Inv. Biológicas* (Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela) 32(3): 179-193.
- 58) **Streit, N.;** Ramírez Mérida, L.G., Queirós Zapka, I.; Jacob-Lopes, E. y otros (2015); Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales; *Ciencia y Tecnol.* 8(2): 27-34.
- 59) **Roy, G.M.** (1995); *Activated Carbon in the Food and Pharmaceutical Industries* (Technomics Publ. Co.; ISBN 1-56676-198-0): 117.
- 60) **Englert, J.;** Milos, K. (2019); methods for producing carotenoids from fermentation by-products; US Patent 10.167.493 B2 (also published as Int. Pat. Appl. WIPO-PCT WO 2014/184052 A1; Eur. Pat. Appl. 2997120 A1).
- 61) **Bates, R.B.;** Schaeffer, J.P. (1977); *Técnicas de Investigación en Química Orgánica* (Prentice Hall Int.; ISBN 0-13-902254-6): 84-89.
- 62) **Guler, C.;** Tunc, F. (1992); Chlorophyll adsorption on acid-activated clay; *JAOCS* 69(9): 948-950; doi: 10.1007/BF02636350
- 63) **González Pradas, E.;** Villafranca Sánchez, M.; Sosías Viciano, M.; Gallego

- Campo, A. (1994); Adsorption of chlorophyll-a from acetone solution on natural and activated bentonite; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 61(2): 175-178; doi: 10.1002/jctb.280610213
- 64) **Kodera, Y.**; Kageyama, H.; Sekine, H.; Inada, Y. (1992); Photo-stable chlorophylls conjugated with montmorillonite; *Biotechnol. Letters* 14(2): 119-122.
 - 65) **Novakovic, T.**; Rozic, L.; Petrovic, S., Stanisavljev, D. (2014); Desorption of β -carotene from bentonite adsorbent under microwave irradiation; *Macedonian J. Chem. and Chem. Eng.* 34(2); 10 pages; doi: 10.20450/mjce.2015.518
 - 66) **Macherey-Nagel (Duren, Germany)** (no date); TLC; Thin Layer Chromatography; Cat. N° TLC 90e1/11/0/12.89PD; pag.63.
 - 67) **Stahl, E.** (1969); Thin Layer Chromatography; a Laboratory Handbook (Springer-Verlag; ISBN 0-387-04736-0): 263-273.
 - 68) **El-Hamidi, M.**; Zaher, F.A. (2016); Comparison between some commons clays as adsorbents of carotenoids, chlorophylls and phenolic compounds from vegetable oils; *Am. J. Food Technol.* 11: 92-99; doi: 10.3923/ajft.2016.92.99
 - 69) **Perman, T.**; Arkeman, Y. (2018); Evaluation of kinetic models of beta-carotene adsorption from palm oil onto bentonite; *Int. J. Sci. Technol. Res.* 7(4): 23-31; pdf.semanticscholar.org/dabc/e345ddbOdb7ebeecf5090f1cab<f6f657f7d2.pdf
 - 70) **Tong, J.**; Wu, Z.; Sun, X.; Xu, X. (2008); Adsorption kinetics of β -carotene and chlorophyll onto activated bentonite in model oil; *Chinese J. Chem. Eng.* 16 (2): 270-276; doi: 10.1016/S1004-9451(08)60074-9
 - 71) **Makhoukhi, B.**; Didi, M.A.; Villemin, D.; Azzauz, A. (2009); Acid activation of bentonite for use as a vegetable oil bleaching agent; *Grasas y Aceites* 60(4): 343-349; doi: 10.3989/gya.108408
 - 72) **Christidis, G.E.**; Kosiari, S. (2003); Decoloration of vegetable oils: a study of the mechanism of adsorption of β -carotene by an acid-activated bentonite from Cyprus; *Clays and Clay Minerals* 51(3): 327-333; doi: 10.1346/CCMN.2003.0510309
 - 73) **Poonpumpnich, W.**; (2003); Separation of carotenoids from palm oil by adsorption on clays; Thesis Ms. Sci.; Chulalongkorn Univ.; ISBN: 974-173-771-8; http://cuir.chula.ac.th/handle/123456789/3345
 - 74) **Zheng, R.**; Gao, H.; Ren, Z.; Cen, D.; Chen, Z. (2017); Preparation of activated bentonite and its adsorption behavior on oil-soluble green pigments; *Physicochem. Probl. Miner. Process* 53(2): 829-845; doi: 10.5277/ppmp170213
 - 75) **Wu, Z.**; Li, Ch. (2009); Kinetics and thermodynamics of β -carotene and chlorophylls adsorption onto acid-activated bentonite from Xinjiang in xylene solution; *J. Hazardous Materials* 171 (1-3): 582-587; doi: 10.1016/j.hazmat.2009.06.047
 - 76) **Farmani, A.**; Hossein, H.K.M.; Hesari, J. (2010); Refining of raw sugar cane juice using bentonite and gelatin and its effects on colorants; *J. Food Res. (Univ. of Tabriz)* 19/1(2): 11 pages; www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?ID=183138

- 77) **Hardyanti**, I.S.; Maghfiroh, H. (2017); Comparison of bentonite and zeolite as adsorbent purification process of patchouli oil (*Pogostemon cablin*); *J. Sci. innovative Res.* 6(2): 87-90; available from www.jsirjournal.com
- 78) **Mumpton**, F.A. (1999); La roca mágica: uses of natural zeolites in agricultura and industry; *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96: 3463-3470 (available from www.pnas.org)
- 79) **Macia**, E.; Monasterolo, V. (sin fecha); Evaluación de los procesos de extracción y purificación de los compuestos endulzantes de la hoja de *Stevia rebaudiana*; Proyecto Final de Grado en Ing. Química (Univ. Tecnol. Nac.; Villa María, Córdoba, Argentina).
- 80) **Lemberg**, R.; Legge, J.W. (1949); Hematin compounds and bile pigments (*Interscience Publ.*, NY): 159-205
- 81) **Gaensslen**, r.E. (1983); Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry (U.S. Department of Justice): 79-88
- 82) **Kistler**, P.; **Nitschmann**, H. (1962); Large scale production of human plasma fractions; *Vox Sanguinis* 7: 414-424.
- 83) **Viljoen**, M.; Shapiro, M.; Crookes, R.; Chalmers, A.; Marrs, S. (1983); "Large scale recovery of human albumin by a chromatographic method" in "Separation of plasma proteins" (Curling, J.M. ed.; Plenary lectures of the 19th Congress of the Int. Soc. Haematol. and the 17th Congress of the International Soc. Blood Transfusion, Budapest, August 1-7, 1982; ISBN 91-970490-0-X): 67-78.
- 84) **Eriksson**, S.; Berglof, J.H.; Suomela, H. (1983); "A one-step method for the removal of coloured, haemoglobin related substances from albumin" in "Separation of Plasma Proteins"; opus cit.: 95-101
- 85) **Vogelaar**, E.F.; Brommhuys, H.G.J.; Beentjes, S.P.; Krijnen, H.W. (1972); Contributions of the optimal use of human blood; *Vox sanguinis* 23: 481-492.
- 86) **De Villiers**, V.; Wilson, J.G.S. (1978); Ethanol and heath-trated plasma fractionation methods in South Africa; *Vox Sang.* 35: 405-411.
- 87) **Díaz**, V.B. (2016); opus cit.: 16-70.
- 88) **Bajpai**, A.K.; Sachdeva, R. (2009); Study on the adsorption of hemoglobin onto bentonite clay surfaces; *J. appl. Polym. Sci.* 85: 1607-1618; doi: 10.1002/app.10698
- 89) **Ralla**, K., Sohling, U.; Riechers, D., Kasper, C. and others (2010); Adsorption and separation of protein by a smectitic clay mineral; *Bioprocess Byosyst. Eng.* 33(7): 847-861; doi: 10.1007/s00449-010-0408-8
- 90) **Lepoitevin**, M.; Jaber.; Guégan, R.; Janot, J.M.; Dejardin, P. et al. (2014); BSA and lysozime adsorption on homoionic montmorillonita: influence of the interlayer cation; *Appl. Clay Sci.* 95: 396-402; doi: 10.1016/j.clay.2014.05.003
- 91) **Lehninger**, A.L. (1972); Bioquímica; Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular (Edit. Omega.; Barcelona; ISBN 84-282-0211-7): 396-400

- 92) **The Merck Index X Edition (1983); pag. 402-403 N°2785.**
- 93) **Dickerson, R.E.; Timkovich, R. (1975); "Cytochromes c" in "The Enzymes" (Boyer, P.D. ed.; Acad. Press London, III Ed.) Vol. 11 Part A: 397-547.**
- 94) **www.debio.com/en/index.php?case=archive&act=show&aid=61. (downloaded on 2 Oct. 2019).**
- 95) **Register of Medicinal Products**, Agency of Medicines (Rep. of Estonia); Of-tan-Catachrom®; www.ravimiregister.ee/en/default.aspx?pv=HumRavimid.Ravim&cvid=7aa601d7-a1a6-4df1-8a2a-d52ae2d1f240 (downloaded on 3 Oct. 2019).
- 96) **Bio Ultra Cytochrome c from equine hearth; Sigma-Aldrich Cat. N° 2867.**
- 97) **Margoliash, E.; Walasek, Z. (1967); Isolation of cytochrome c employing a dilute aluminium sulfate solution; US Patent 3342796.**
- 98) **Margoliash, E.; Walasek, Z. (1967); Cytochrome c from vertebrate and invertebrate sources; Meth. Enzymol. (Estabrock, R.W.; Pullman, M.E. eds.); 10: 339-348.**
- 99) **Comunicación privada al autor del Dr. Umberto Colombo (†) (1987).**
- 100) **Hristova, S.H.; Zhivkov, A.M. (2015); Adsorption of cytochrome c on montmorillonite nanoplates; protein concentration dependence; J. Colloid Interface Sci. 446: 252-262; doi: 10.1016/j.jcis.2015.01.039**
- 101) **Vinu, A.; Murugesan, V.; Tangermann, O.; Hartmann, M. (2004); Adsorption of Cytochrome c on mesoporous molecular sieves: influence of pH, diameter and aluminium incorporation; Chem. Mat. 16(16): 3056-3065; doi: 10.1021/cm049718u**
- 102) **Vinu, A.; Hartmann, M. (2004); "Adsorption of cytochrome c on MCM-41 and SBA-15: influence of pH" in "Studies in Surface Science and Catalysis" (van Steen, E.; Callanan, L.H.; Clarys, M. eds.; Elsevier B.V.) 154 part C: 2987-2994.**
- 103) **Adsorption of cytochrome c on the extrudates of mesoporous molecular sieves (no authors, no date); shodganga.inflibnet.ac.in/bitstream/1603/27637/11/11_chapter6.pdf (downloaded on 28 Oct. 2019)**
- 104) **Chandrasekar, G. Hartmann, M.; Murugesan, V. (2014); Immobilization of cytochrome c on the cylindrical mesoporous silica extrudates; J. Nanosci. Nanotechnol. 14(3): 2606-2613; doi: 10.1166/jnn.2014.8533**
- 105) **El-Gengaihy, A.E.; Abdelhadi, S.I.; Kirmani, J.F.; Qusreshi, A.I. (2007); 6.34-Thrombolytics; Comprehensive Med. Chem. II, 6: 763-781; doi: 10.1016/BO-o8-045044-X/00196-6**
- 106) **Macfarlane, R.G.; Pilling, J. (1947); Fibrinolytic activity of normal urine; Nature 159: 779; doi: 10.1038/159779a0**
- 107) **Nobuhara, M.; Sakamaki, M.; Ohnishi, H.; Suzuki, Y. (1981); a comparative study of high molecular weight urokinase and low molecular weight urokinase; J. Biochem. 90(1): 225-232; doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133453**
- 108) **Urokinase human; Cat. N° ENZ-264; Prospec Protein Specialist; www.prospecbio.com/urokinase_human**

- 109) **Bansal, V.**; Roychoudhury, R.K.; Kumar, A. (2007); Urokinase separation from cell culture broth of a human kidney cell line; *Int. J. Biol. Sci.* 3(1): 64-70; doi: 10.7150/ijbs.3.64
- 110) **Urokinase type Plasminogen Activator (uPA) (1 x 100.000 units); Aniara Cat**, AEZ 005c-OND (in vitro use only); Aniara Diagnostica (Ohio); www.aniara.com/PROD/aez005c-ond.html
- 111) **Urokinase type plasminogen activator (uPA); Coachrom Cat. N° HUPA1K; Coachrom Diagnostica GmbH (Austria); www.coachrom.com/fileadmin/docs/pro/HUPA1000K.pdf**
- 112) **Singher, H.O.**; Zuckerman L. (1961); Urokinase- A plasminogen activator and methods of obtaining the same; US Patent 2989440
- 113) **Kjeldgaard, N.O.**; Ploug, J. (1961); Urokinase and method of recovering the same; US Patent 2983647
- 114) **Lesuk, A .** (1967); Recovery and purification of urokinase; US Patent 3355361
- 115) **Sloane, N.H.** (1969); Method of production of urokinase; US Patent 3477910
- 116) **Sloane, N.H.** (1969); Method of production of urokinase; US Patent 3477911
- 117) **Sloane, N.H.** (1969); Method of production of urokinase; US Patent 3477912
- 118) **Sloane, N.H.** (1969); Method of production of urokinase; US Patent 3477913
- 119) **Sloane, N.H.** (1975); Production of urokinase; US Patent 3884760
- 120) **Novak, L.J.** (1973); Method for recovering urokinase from urine containing the same; US Patent 3755083
- 121) **Hafelih, R.** (1981); Process for the production of urokinase in pure conditions; US Patent 4259447
- 122) **Edmunds, T.**; Foley, S.F. (1990); Recovery of urokinase compounds; US Patent 4920051
- 123) **Díaz, V.B.** (2017); *Polisacáridos Industriales de Interés Farmacéutico*; aislamiento, purificación, fraccionamiento (AMV Ediciones, Madrid; I edición; ISBN 978-84-945166-6-5): 47-51; 106-162
- 124) **Merck Index X edition (1983); Avoparcin [894]**, page 128.
- 125) **Waite, J.P.** (1990); Process for producing avoparcin antibiotics free from biomass; Hungarian Patent HU 201807 B
- 126) **Adams, M.**; Hudson, C.S. (1941); factors influencing the use of bentonite in the purification of invertase; *JBC* 140: iii-exlvii; www.jbc.org/content/140/1/iii.full.pdf
- 127) **Dunn, D.B.**; Hitchborn, J.H. (1965); The use of bentonite in the purification of plant viruses; *Virology* 25(2): 171-192; doi: 10.1016/0042-6822(65)90198-4
- 128) **Das, D.**; Das, D. (2019); *Biochemical Engineering; an introductory textbook* (J. Stanford Publ., Singapore; ISBN 978-0-429-03124-3; e-book): [5] Immobilized Enzymes.129)

TÓPICO 5

CASEINFOSFOPÉPTIDOS. Producción Química

5.1) Introducción

Como es bien sabido, la hidrólisis de las proteínas conduce a la obtención de péptidos de distinto peso molecular y también aminoácidos libres. Dentro de los métodos preferenciales de hidrólisis de las proteínas, se encuentra la hidrólisis enzimática, dada las condiciones de suavidad en las que generalmente se lleva a cabo el proceso, la conservación de la configuración *levo* de los aminoácidos resultantes, la ausencia de destrucción de aminoácidos (o su conversión a estructuras indeseables), tal como sí sucede en los procesos de hidrólisis ácida o alcalina, y en fin, el mayor rendimiento en péptidos, en gran parte debido a las razones ya expuestas. Dentro de la masa de péptidos obtenidos a partir de algunas proteínas en particular, se destacan ciertos oligopéptidos con interesantes propiedades biológicas, en algunos casos presentando un mismo oligopéptido, diversos tipos de actividad biológica. Doblemente interesante es el hecho de que no son pocas las proteínas que proporcionan péptidos bioactivos frente a la hidrólisis enzimática, ya sea ésta endógena (pepsina, tripsina) o practicada en fábrica con proteasas industriales (habitualmente subtilisinas, aunque pueden ser también de origen fúngico). Algunas proteínas que producen péptidos bioactivos por excelencia son las que conforman la sangre de animales destinados a consumo humano, así como las constituyentes del volcado visceral (fundamentalmente estómago e intestino) de los mismos. Dentro de las proteínas de la sangre, la hemoglobina se caracteriza por rendir una gran variedad de tales péptidos bioactivos, denominados **hemorfinas** en este caso particular, y cuya descripción y métodos de obtención han sido revisados recientemente en una obra del presente autor (véase (1) y bibliografía allí referenciada). Las proteínas contenidas tanto en la yema del huevo de gallina, así como del blanco del huevo (clara de huevo u ovoalbúmen) también son fuertes productoras de péptidos bioactivos, entre ellos la *ovokinina* (octapéptido) derivada de la proteólisis de la ovoalbúmina; proteínas menos abundantes en la clara de huevo, tal como la lisozima, también proporcionan péptidos bioactivos por proteólisis (2); de la misma manera, proteínas presentes en las leguminosas, suero de leche, gelatinas de diverso origen y otras proteínas de origen vegetal, también producen péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática (3). La leche, con sus diferentes tipos de caseínas, lactoalbúmina y lactoglobulina, también produce péptidos bioactivos, de la misma forma que las proteínas cárnicas, de pescado, soja, sésamo,

bróccoli y arroz (4)(5)(6). Dependiendo de su origen y estructura, algunas actividades biológicas de estos péptidos bioactivos son:

- Efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (angiotensin converting enzyme, ACE) (1)(2)(3)(4)(5)(6).
- Prevención de enfermedades cardiovasculares: antihipertensivos (2)(4)(5).
- Antioxidantes (4)(5).
- Antimicrobianos (2)(5)
- Transporte de calcio (2)(4)(6)
- Actividad opioide (1)(3)(5)(6)
- Participación en la salud intestinal (5)
- Normoglucemiantes y normolipemiantes (4)
- Actividad antineoplásica (4)
- Efectos inmunomoduladores (4)(6).

Como se ha adelantado, las proteínas de la leche son capaces de proporcionar una interesante variedad de péptidos bioactivos, fosforilados, denominados **caseinfosfopéptidos** (casein phosphopeptides; CPP), fundamentalmente proporcionados por la caseína láctica. Que la leche es un alimento absolutamente saludable, no sólo para los seres humanos, sino para los animales, es un hecho perfectamente conocido y documentado por doquier (7)(8) y no haría falta redundar en este conocimiento. Sin embargo, notablemente se ha generado en los últimos tiempos discusiones poco serias y no documentadas científicamente alertando sobre prejuicios que su consumo puede generar en la salud del consumidor, aconsejando reemplazarla por otros sustitutos (por ejemplo, las erróneamente llamadas “leches vegetales”: leche de almendras, etc. que, obviamente, no son leche). Esto ha generado una disminución importante en el consumo de lácteos, con la reducción concomitante de la ingesta de calcio, vitamina D, proteínas lácteas, azúcares, minerales y micronutrientes, ocasionando evidentes y bien conocidos perjuicios para la salud (8).

Las proteínas de la leche están constituidas por las caseínas y las proteínas del suero de la leche (lactoalbúmina, lactoglobulina, inmunoglobulinas, seroalbúmina y otras proteosomas y peptonas). La caseína está conformada por cuatro constituyentes, a saber, α s1 caseína, α s2 caseína, β -caseína y κ -caseína, así como un constituyente menor denominado γ -CN. La caseína es la proteína mayoritaria en la leche (24-29g/l), y dentro de la misma, las variedades presentes en mayor proporción son la α s1-caseína (38%) y β -caseína (36%) (9). Estas proteínas contenidas en la leche proporcionan gran cantidad de péptidos bioactivos por hidrólisis, péptidos que son inactivos dentro de la secuencia estructural madre de la proteína nativa, pero que al ser liberados por hidrólisis enzimática actúan como moduladores biológicos, revelando muchos de ellos, actividades multifuncionales (10). Una excelente tabulación de las relaciones estructura-actividad de estos biopéptidos (no sólo caseínicos) se encuentra publicada en (10)(11)(12). Acorde

con estas referencias, las principales actividades biológicas que exhiben los oligopéptidos provenientes de la caseína son:

- Antioxidantes
- Agonistas opioides
- Inmunomoduladores
- Inhibidores de ACE
- Transportadores del calcio y de otros minerales. Promoción de la remineralización del esmalte dentario.
- Antitumorales
- Antagonistas opioides (péptidos derivados de la κ -caseína, *casoxinas*).

Aproximadamente el 30% del P total de la leche se encuentra esterificando los residuos *serina* de la caseína, y por hidrólisis de la proteína se generan estos caseinfosfopéptidos (CPP); en su gran mayoría, estos CPP contienen un locus de serina fosfato y ácido glutámico, compuestos por la secuencia de 3 grupos serina y 2 glutámico, mostrando marcadas diferencias en la ubicación de los enlaces fosfato (10). Estas diferentes y benéficas bioactividades han aconsejado su incorporación a alimentos funcionales bajo el concepto de nutraceuticos (12), como constituyente de dietas de contenido reducido en fenilalanina (13), para la captación de calcio, robusteciendo así la reconstitución ósea cuando forman parte de suplementos cálcicos o alimentos funcionales (14). De la misma forma, se ha estudiado recientemente la fortificación de leches con hierro, dada la alta afinidad que esta catión presenta con el CPP; se facilita así la absorción de hierro en el intestino delgado (15); la estructura preferencial de tales fosfopéptidos contiene secuencias ácidas polares constituídas por Ser(P)- Ser(P)- Ser(P)- GlutH- GlutH (15).

Un uso que es obligatorio mencionar es la utilidad de los CPP en tratamientos odontológicos, dado su positiva bioactividad en los procesos de remineralización del esmalte dentario (16), característicamente cuando se lo administra bajo la forma de complejo de caseinfosfopéptido- fosfato de calcio amorfo, dado que *“el CPP-ACP es una fosfoproteína con capacidad de liberar iones de calcio y fosfato en el medio bucal, que promueven la remineralización”* (17); sin embargo, debe hacerse notar que este tratamiento no parece más efectivo que la topicación con flúor (18). En el campo de la Medicina, la κ -caseína de la leche de mamíferos (bovinos, burra, cabra, yegua) expresa diferentes actividades terapéuticas, ya sea *per se* o como los CPP correspondientes, y utilidad en la preparación de quesos y yogures con funciones nutraceuticas, y de allí el interés del incremento genético del tenor de κ -caseína en leches de animales de manejo zootécnico (19).

5.2) Producción química de CPP

Básicamente, la hidrólisis de la caseína llevada a cabo por proteasas (pepsina, tripsina, también proteasas industriales tales como mlas subtilisinas) conduce a la formación de oligopéptidos cuyo tamaño es irreductible, es decir, la hidrólisis avanza hasta un nivel de peso molecular, alcanzado el cual no evoluciona o lo hace dificultosamente, acorde a las condiciones de hidrólisis. Tales oligopéptidos contienen P en un tenor elevado, que puede alcanzar el valor de 6%, y sus sales con cationes di y trivalentes son solubles al pH alcalino del tránsito intestinal. Tales CPP contienen dos oligopéptidos tetrafosforilados homólogos que se encuentran en las dos caseínas α_1 y β , en los que el P se encuentra siempre monoesterificando el grupo serina, los cuales se eliminan fácilmente de la serina por tratamiento alcalino vía un proceso de β -eliminación con la creación concomitante de un enlace olefinico: la serina se transforma en dehidro alanina la cual se puede combinar con restos lisina para formar lisino-alanina (20). De tal forma, y como ya se ha puntualizado, CPP actúan como aditivos alimenticios funcionales (*functional foods*) dada su actividad solubilizante de cationes tales como el Fe^{++} , Zn^{++} y Mg^{++} , su aptitud de incrementar la masa ósea y prevención de caries, estimulando además el sistema inmune. Desde el inicio, es adecuado puntualizar el extenso uso de tecnologías de separación por membranas (UF, diafiltración, NF, RO) para la obtención técnica de tales CPP a escala comercial, y en ese sentido, son los tempranos trabajos de Brule y colaboradores, la base sobre la que descansan los distintos métodos de obtención, los cuales se han ido sofisticando con el curso del tiempo. En 1979, Brule et al. (21) obtiene fosfocaseinato nativo con aprovechamiento del suero de leche utilizando únicamente técnicas físicas de separación, tales como las mencionadas. Dada la disponibilidad de fosfocaseinato obtenido de tal manera, el mismo grupo de investigaciones acomete la preparación de CPP por proteólisis del fosfocaseinato utilizando técnicas de UF sobre el digerido enzimático (22). La proteasa queda en el retentato mientras que el permeato contiene péptidos fosforilados y no fosforilados; una posterior adición de un catión bivalente origina agregados de fosfopéptidos mientras que los péptidos no fosforilados son indiferentes: el mayor tamaño molecular de tales agregados de CPP permite que sean retenidos por membranas de cut-off adecuado y separados así eficientemente de los péptidos sin fosforilar; con tal fin, resulta adecuada una membrana de UF cut-off 2-10 kDa. Los CPP así obtenidos son útiles para la constitución de medicamentos para alimentación enteral y alimentos tales como las leches maternizadas, dada su favorable relación P orgánico/P inorgánico (22)(23). A su vez, los CPP han sido seleccionados en base a sus distintas bioactividades, por ejemplo, la fracción anticariogénica. Reynolds (24) describe la preparación de tal fracción a escala industrial a través de métodos de UF basados en los criterios previamente descubiertos por Brule et al. (22)(23). El descubrimiento de Reynolds (24) se basa en que los péptidos anticariogénicos conteniendo

la secuencia -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- forman agregados hexaméricos frente al agregado de Ca^{++} , los cuales son separados de los CPP más pequeños por métodos de UF a través de emmbranas de cut-off 10-20 kDa, formando parte del retentato. El calcio puede ser reemplazado por zinc o hierro, pero los cationes deben estar siempre presentes durante el proceso de fraccionamiento por UF para impedir la desarticulación de los agregados pesados que forman los CPP anticariogénicos (24). La refinación de estas fracciones se logra diafiltrando extensamente versus soluciones de los citados cationes; el exceso de cationes inorgánicos se eliminan eficientemente diafiltrando el retentato versus agua destilada a través de una membrana de cut-off 1000 Da. Este elegante método permite aislar con gran rendimiento y pureza la fracción anticariogénica (constituída fundamentalmente por cuatro CPP, acorde con Reynolds (24)). En otro procedimiento, el proteolizado caseínico se somete a precipitación en presencia de Ca^{++} (20 moles/mol de caseína inicial) y adición de etanol csp 50% (practicamente, adición de 1 volumen de etanol absoluto) a pH 4,6 o 8,0 (25). Interesantemente, el precipitado obtenido a pH 4,6 contiene altas concentraciones de la fracción deseada con contenidos minoritarios de péptidos defosforilados, los cuales a su vez, están presentes en la fracción que precipita a pH 8,0 (25). Adecuadas combinaciones de los criterios volcados en (22)(23)(24)(25) son de práctica habitual y ampliamente descriptos (13), a saber:

- Precipitación del digerido caseínico con etanol (50%) en presencia de Ca^{++} a pH 4,6 (monofosforilados).
- UF cut-off 10 kDa en presencia de CaCl_2 y posterior diafiltración versus agua (1 kDa) para eliminar calcio inorgánico.
- Reemplazo del Ca^{++} por Zn^{++} , ultrafiltración (10 kDa) y diafiltración (1 kDa) para eliminar exceso de Zn^{++} inorgánico.
- En otros casos, Ca^{++} que forma parte de los agregados, es eliminado por intercambio iónico (Amberlite IRC-50) (15).

Para su administración, tales CPP pueden ser vehiculizados de diferentes maneras, incluida su presencia en bebidas ácidas (26). También han sido producidos animales transgénicos que producen la denominada β -caseína con alto contenido de la misma en su leche, de la cual se obtienen CPP con secuencias especiales (27). Por su facilidad de realización, los métodos de precipitación de CPP con etanol en presencia de Ca^{++} a distintos pH, siguen siendo estudiados activamente. Cruz Huerta et al. (28) demuestran que, efectivamente, la precipitación efectuada a pH 6,0-8,0 permite obtener fracciones de CPP altamente fosforiladas:

- A pH 3,5 precipita selectivamente CPP con la secuencia [Ser(P)]₃- [Glu]₂ (28)
- A pH superiores, se recuperan mayoría de CPP mono y difosforilados (28).

Recientes estudios (29) demuestran que el tiempo de proteólisis y la relación enzima-sustrato son críticos. Por ejemplo, utilizando pancreatina en relación 1:100, el rendimiento máximo de CPP se obtiene a los 90 minutos de hidrólisis, experimentándose pérdidas de rendimiento si el proceso se continúa, aparentemente por decremento en el peso molecular de los CPP luego de determinado tiempo de hidrólisis (29). Estos detallados estudios demuestran la importancia que tienen las variables de proceso, como ser:

- Tipo de proteasa
- Relación enzima- sustrato
- Condiciones de proteólisis (tiempo, temperatura, pH, concentración de la caseína en solución, etc.
- Necesidad del seguimiento analítico del proceso a tiempos determinados, para establecer las mejores condiciones técnicas de obtención de CPP. Naturalmente, esto ha sido tenido en cuenta y estudiado, dando origen a numerosos documentos patentarios, por demás ilustrativos, que habitualmente hacen uso de los métodos de ultrafiltración. En lo referente a las proteasas utilizadas, se encuentran tripsina y quimotripsina, papaína y proteasas industriales neutras o alcalinas (subtilisinas o de origen fúngico), o bien combinaciones entre ellas (30).

Las membranas de UF utilizadas pueden tener un cut-off de 3-5 kDa a lo que sigue un proceso de desalinización por nanofiltración (150 Da) (30).

Heptapéptidos aislados de los productos de hidrólisis de la caseína α s1, presentan actividad ansiolítica; estos oligopéptidos, que presentan una secuencia aminoácídica perfectamente determinada, han sido reivindicados como productos útiles en el tratamiento de los desórdenes ansiosos, epilepsia e insomnio (31); en suproceso de obtención, la caseína α s1 se hidroliza primero con tripsina y luego con pepsina. El heptapéptido puede ser aislado y purificado por métodos establecidos, por ejemplo, UF cut-off 1000 Da (31).

La caracterización analítica de los CPP es compleja, pero se encuentra perfectamente detallada (32)(33).

Los complejos de fosfato de calcio-CPP han demostrado ser útiles en el tratamiento de enfermedades de carencia de calcio, especialmente de los huesos; dichos complejos se constituyen generando fosfato de calcio *in situ* dentro de una solución acuosa de determinados CPP, a través de procesos de preparación descritos con absoluta claridad por Reynolds (34).

Referencias bibliográficas

- 1) **Díaz**, V.B. (2016); *Conversión Técnica de Proteínas*; valorización de desechos proteicos (AMV Ediciones; Madrid; I edición, ISBN 978-84-945558-3-1): 45-70.
- 2) **Abdou**, A.M.; Kim, M.; Sato, K. (2013); "Functional proteins and peptides of hen's egg origin" in *Bioactive Foods Peptides in Health and Disease* (Hernández-Ledesma, B.; Hsieh, Ch. eds.; IntechOpen; ISBN 978-953-51-0964-8): 115-144; doi: 10.5772/54003
- 3) **Hernández-Ledesma**, B.; Hsieh, Ch-Ch. (2013); *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* (IntechOpen; ISBN 978-953-51-0964-8); doi: 10.5772/3318; library.umac.mo/ebooks/b28113329.pdf
- 4) **Shahidi**, F.; Zhong, Y. (2008); *Bioactive Peptides*; JAOAC Int. 91(4): 914-931
- 5) **Harnedy**, P.A.; Fitzgerald, R.J. (2012); *Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: a review*; J. Func. Foods 4: 6-24
- 6) **Sharma**, S.; Singh, R.; Rana, S. (2011); *Bioactive peptides: a review*; Int. J. Automation 15(4): 223-250
- 7) **Fundación Española de Nutrición (FEN) y Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT) (2015)**, *La leche como vehículo de salud para la población*; I edición.
- 8) **Rodríguez-Huertas**, J.; Rodríguez Lara, A.; Acevedo, O.G.; Mesa, M.D. (2019); *Leche y productos lácteos como vehículos de calcio y vitamina D: papel de las leches enriquecidas*; *Nutrición Hospitalaria*; Ref: 10.20960/nh.02570, revisión 2570 (43 pags).
- 9) **Audic**, J.L.; Chaufer, B.; Daufin, G. (2003); *Non-food applications of milk components and dairy co-products: a review*; *Le Lait* 83(6): 417-438; doi: 10.1051/lait:2003027
- 10) **Oliva**, Y.; Vega. S. (2004); *Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: propiedades y aplicaciones principales*; *Rev. Salud Animal* 26(3): 151-162.
- 11) **Fuentes-García**, P.E. (2017); *Péptidos bioactivos derivados de la leche de bovinos y sus efectos fisiológicos en humanos: generalidades y aspectos moleculares*; Centro de Biotec. Genómica, Inst. Politécnico nacional (CBG- IPN); 23 pags.
- 12) **Pinto**, G. (no date); *Casein phosphopeptides as posible nutraceuticals for functional foods*; Dottorato in Scienze Biotecnol.; Univ. di Napoli Federico II. fedos.unina.it/4067/i/Gabriella_Pinto_dottorato_xxii_ciclo_scienza_biotec._industriale.pdf
- 13) **Kruger**, C. Ch.; Azevedo, T.D.; Piltz, M.; Silva, A.T.; Candido, L.M.B. (2018); *Péptidos derivados de la caseína como ingrediente alternativo para las dietas bajas en fenil alanina*; *Nutrición Hospitalaria*, ref: 10.20960/nh.2391; OR2391 OTROS (16 pags).

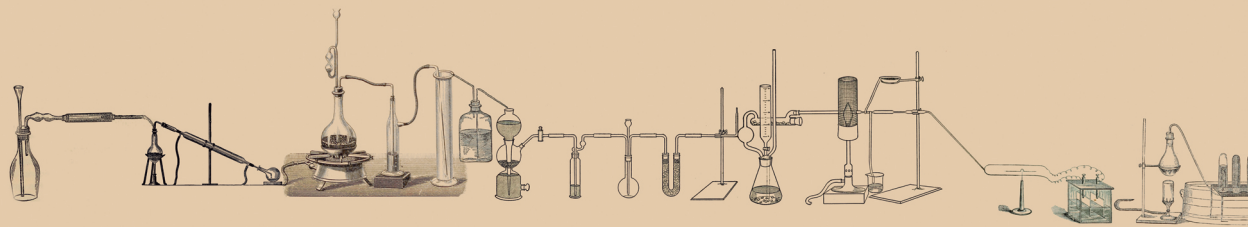
- 14) **Liu, G.**; Sun, S., Guo, B.; Miao, B. et al. (2018); Bioactive peptides isolated from casein phosphopeptides promotes calcium uptakes in vitro and in vivo; *Food & Function* 9(4): 2251-2260; doi: 10.1039/C7FO01709J
- 15) **Smialowska, A.M.** (2017); Goat and cow casein derived ingredients and their interactions with iron; Ph.D. Thesis in Food Technol. (Massey Univ., NZ).
- 16) **Cedillo Valencia, J.J.** (2012); Uso de los derivados de la caseína en los procesos de remineralización; *Práctica Clínica LXIX* (4): 191-199; medigraphic.com/pdfs/odm/od-2012/od124i.pdf
- 17) **Juárez-López, M.L.A.**; Hernández-Palacios, R.D.; Hernández-Guerrero, J.C.; Jiménez-Farfán, D.; Molina-Frechero, N. (2014); Efecto preventivo y de remineralización de caries incipientes del fosfopéptido de caseína fosfato de calcio amorfo; *Revista de Inv. Clin.* 66(2): 144-151; medigraphic.com/pdfs/reinvclin/nn2014/nn141g.pdf
- 18) **Ortiz Muñoz, L.** (2016); Eficacia clínica del fosfopéptido de la caseína-fosfato de calcio amorfo. Revisión sistemática; Trabajo Final de Grado en Odontología (Univ. de Sevilla).
- 19) **Guevara-Garay, L.A.**; Cuartas-Castaño, D.B.; Llano-Naranjo, F. (2014); Kappa caseína de la leche: aspectos bioquímicos, moleculares, productivos y nutricionales; *Rev. Med. Risaralda* 20(1): 29-33
- 20) **Alais, Ch.** (2003); Ciencia de la Leche; principios de técnica lechera (Reverté, Barcelona; ISBN 84-291-1815-2 reimpresión): 135-135.
- 21) **Brule, G.** Fauquant, J.; Maubois, J-L. (1979); Preparation of “native” phosphocaseinate by combining membrane ultrafiltration and ultracentrifugation; *J. Dairy Sci.* 62: 869-875; [journalofdairyscience.org/S0022-0302\(79\)83341-X/pdf](http://journalofdairyscience.org/S0022-0302(79)83341-X/pdf)
- 22) **Brule, G.**; Roger, L.; Fauquant, J.; Piot, M. (1982); Phosphopeptides from casein-based materials; US Patent 4358465.
- 23) **Brule, G.**; Roger, L.; Fauquant, J., Piot, M. (1989); Casein phosphopeptide composition; US Patent 4816398.
- 24) **Reynolds, E.Ch.** 81992); Production of phosphopeptides from casein; WO Patent Appl. (PCT-WIPO) WO 92/18526 (also published as EP 058069 A4; CA 2108678 A1)
- 25) **Adamson, N.J.**; Reynolds, E.C. (1995); Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions; *Biotechnol. Bioeng.* 45(3): 196-204; doi: 10.1002/bit.260450303
- 26) **Naito, H.**; Noguchi, T.; sato, R.; Tsuji, K.; Hidaka, H. (1995); Transparenta cid drink containing acid-soluble casein phosphopeptide; US Patent 5405756
- 27) **Han, s.K.**, Shin, Y.Ch. (1998); Casein phosphopeptide, casein containing same and process for the preparation thereof; US Patent 5834427.
- 28) **Cruz-Huerta, E.**; García-Nebot, M.J.; Miralles, B.; Recio, I., Amigo, L. (2014); Obtención de caseinfosfopéptidos a partir de un subproducto de caseína: efec-

- to del tiempo de hidrólisis y el pH de precipitación; Digital. CSIC (CSIC-UAM-Inst. Inv. Ciencias de la Alimentación, CIAL, editor); <http://hdl.handle.net/10261/115309>
- 29) **Yukalo, V.**; Krupa, O.; Storozh, I. (2019); Characteristics of proteolytic processes during the isolation of natural casein phosphopeptides; Ukrainian Food Journal 8(1): 61-69; doi: 10.24263/2304-974X-2019-8-1-7
 - 30) **Chinese patent application CN 103571905 A (2014)**, Preparation methods of high-purity casein phosphopeptide.
 - 31) **Balandras, F.**; Miclo, I., Gaillard, J-L; Le Roux, Y.; Laurent, F. (2014); Casein-derived peptides having anxiolytic activity; US Patent 8685933
 - 32) **Naqvi, M.A.**; Singh, J.; Han, E., Farshad, K.; Rousseau, D. (2016); Purification and identification of β -casein phosphopeptides (1-25); J. Dairy Sci. 99: 7803-7808; doi: 10.3168/jds.2016-11010
 - 33) **Larsen, M.R.**; Graham, M.E.; Robinson, P.J.; Roepstorff, P. (2004); Improved detection of hydrophilic phosphopeptides using graphite powder microcolumns and mass spectrometry; Molecular & Cellular Proteomics 3.5: 456- 465.
 - 34) **Reynolds, E.** (2013); Complejos de calcio y de fosfopéptidos; Patente Española 2434097 T3 (traducción de Patente Europea EP 0968218).

LIBRO EDITADO POR



EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA



Sin exclusión de los estudiantes de las carreras de Química, Farmacia y Bioquímica Industrial que puedan estar interesados, este libro está fundamentalmente destinado a químicos técnicos que encaren trabajos de desarrollo y puesta a punto de métodos de producción industrial sobre los tópicos aquí desarrollados, que son:

Tópico 1: Actividad del peróxido de hidrógeno sobre los polisacáridos en general y sobre heparina en particular; generación de alteraciones estructurales características.

Tópico 2: Expansores plasmáticos de base proteica. Producción química.

Tópico 3: Complejos orgánicos y quelatos de microelementos útiles en sanidad animal. Producción Química.

Tópico 4: Bentonitas y sus aplicaciones en la Industria Bioquímica

Tópico 5: Caseinfosfopéptidos. Producción Química

En resumen, es una obra de carácter químico-técnico netamente definido, que pretende operar como una guía para el profesional, facilitando la investigación bibliográfica previa a los trabajos de laboratorio, y aportando ideas y sugerencias que el autor cree pueden ser de utilidad.



9 789878 707327



EDITORIAL AUTORES DE ARGENTINA