



Centro de Histoterapia
Placentaria

Centro de Histoterapia Placentaria

Instituto de Farmacia y Alimentos. Departamento de

Química Farmacéutica

Cordones umbilicales residuales, nueva fuente de
obtención de ácido hialurónico y sus fracciones .

Tesis en opción al grado científico de Doctor en

Ciencias Farmacéuticas

Autor: Lic. Guillermo Lago Mendoza

Tutores: Dr. José A.Cremata.

Dr. Gabriel Coto Valdés

Ciudad de la Habana

2007

A la memoria de mi Padre

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primer lugar al profesor y director Dr. Carlos Manuel Miyares Cao y su esposa Msc Ileana Hollands Barca por su apoyo y colaboración para la realización de esta tesis, que es fruto de la investigación de muchos años y cuyos resultados se han venido materializando para bienestar de nuestro pueblo.

Agradecer al colectivo de la Subdirección de Investigaciones del Centro de Histoterapia Placentaria y especialmente al Dr. Gabriel Coto Valdés por su participación como tutor de esta tesis, a los compañeros Efreín Lauzán y Mercedes Álvarez por la valiosa cooperación y apoyo brindado. Dentro de este colectivo quiero destacar al compañero Ramón García Alea por el apoyo brindado en la impresión de este documento.

Quiero agradecer a los compañeros especialistas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología MsC Leonardo Canaan, Ing. Osvaldo Reyes Acosta y su esposa y muy especialmente al estimado amigo y colaborador Dr. José A Cremata por su desinteresada participación en la tutoría de esta tesis.

Deseo agradecer a un amigo de toda la vida que es el Dr. Miguel Antonio López López del Centro de Química Farmacéutica, al Dr. Eduardo Duarte y a la Dra. Nancy Martínez del Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras, al Dr. Jorge Luís Santana Romero del Instituto Superior de Ciencias y Tecnología Aplicada y a la Dra. Rosa Maria Álvarez Móntela del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. Estos compañeros

tuvieron un criterio favorable para la presentación de esta tesis doctoral mediante los avales emitidos a tales efectos.

Especial mención debo dar, al Dr. John F. Kennedy de la Universidad de Birgimigan UK por la asesoría brindada y al Dr. Christ Jones del Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control (NIBSC) UK por al apoyo brindado en la realización del espectro RMN bidimensional.

Al Dr. Carlos Pérez de la Facultad de Química Universidad de la Habana por su apoyo en la obtención del espectro de RMN ¹³ C del producto.

Al Dr. Vicente Verez Vencomo del Laboratorio de Antígenos de la Universidad de la Habana por brindarme la posibilidad del empleo de sus instalaciones durante la etapa de investigación.

A la Dra. Loida Oruña del Centro de Inmunología Molecular (CIM), por haberme permitido trabajar en colaboración con vistas a la realización de la preclínica farmacológica de estos productos y sus formulaciones.

A la Dra. Lisette García Bajos de SERVIMED por la ayuda brindada en la prestación de medios audiovisuales.

A los compañeros de la subdirección de aseguramiento de la calidad del Centro de Histoterapia Placentaria especialmente a la MsC Marta Ileana Flores por su apoyo en la obtención de los registros sanitarios de estos productos.

A la Ing. Maria de los Ángeles Jiménez quién siempre me apoyo en todo momento.

A la Ing. Yanitza Ricardí la cual ha tenido mucha paciencia para conmigo en la elaboración de las imágenes de la tesis.

Al Reverendo David Figueredo, presbítero de la Iglesia Bethel, por brindarme el apoyo espiritual y material necesario para la realización de esta tesis.

A los oponentes Dra. Migdalia Miranda profesora titular del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) y a la Dra. Josefa Victoria Hormaza Montenegro del Instituto Cubano de Investigaciones Azucareras por las sugerencias tan valiosas que me permiten culminar esta tesis.

A mi madre, esposa, hija y yerno, los cuales nunca tendré con que pagar la paciencia que han tenido conmigo.

A todos los compañeros del Centro de Histoterapia Placentaria y a esta revolución que gracias a ella ha permitido lograr estos resultados.

SÍNTESIS

Se ha notado un interés creciente a nivel mundial en las investigaciones de las sustancias poliméricas, sobre todo a partir de fuentes naturales, entre los que se encuentran los cordones umbilicales humanos, que al igual que las crestas de gallo, han sido fuente de obtención de sustancias con actividad biológica entre los que se puede encontrar al ácido hialurónico (AH) y otros polisacáridos conocidos como glucosaminoglicanos (GAGs). Especial vigencia en la terapéutica, tiene el AH, evidenciado a través de numerosos estudios en los que se destaca su potencialidad como acelerador en los procesos de cicatrización y como antiinflamatorio de diferentes afecciones dérmicas. En el presente trabajo se discute un método de obtención de AH, a partir de un subproducto generado de la fabricación del Gel Fotoprotector. El mismo no ha sido informado como fuente de esta biomolécula en la literatura, ni tampoco el aprovechamiento del etanol residual subproducto de la precipitación de este polisacárido. Éstos se caracterizaron por métodos químicos y fisicoquímicos. El polisacárido obtenido tiene interés tanto en la producción cosmética, como en la industria médico farmacéutica y de esta forma se han elaborado a partir del mismo un jabón, gel y loción evaluadas para el tratamiento antiacné, así como un gel cicatrizante propuesto en el tratamiento de úlceras flebostáticas y una loción para después de afeitar, ya comercializada.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
SINTESIS.	
LISTA DE ABREVIATURAS.	
INTRODUCCION.	1
I. REVISION BIBLIOGRAFICA.	6
I.1 Características estructurales.	6
I.2 Funciones biológicas del ácido hialurónico.	11
I.3 Usos generales del ácido hialurónico	13
I.4 Aislamiento, purificación y caracterización de ácido hialurónico.	14
I.4.1 Métodos de aislamiento.	14
I.4.2 Métodos de purificación, identificación y análisis.	21
II. MATERIALES Y METODOS.	31
II.1 Caracterización del cordón umbilical residual empleado para la obtención del ácido hialurónico.	31
II.2 Obtención de un crudo que contiene ácido hialurónico (CAH), a partir de cordones umbilicales convencionales y cordones residuales.	31

	Pág.
II.3 Caracterización del CAH, obtenido tanto de cordones umbilicales convencionales como cordones residuales. Comparación entre ambos.	35
II.3.1 Determinación cualitativa de hexosaminas presente en el CAH.	35
II.3.2 Determinación de la concentración proteica.	35
II.3.3 Determinación de azúcares reductores.	36
II.3.4 Determinación colorimétrica de ácidos urónicos según el método de Blumerkrans y Asboe-Hansen.	36
II.3.5 Determinación del contenido de ácidos nucleicos en cada una de las etapas del proceso de obtención empleando cordones residuales.	37
II.3.6 Determinación de la humedad residual en el CAH.	37
II.3.7 Determinación del pH en solución al 1% p/v.	37
II.3.8 Análisis estadístico de los resultados.	37
II.3.9 Estudio de la estabilidad del CAH.	38
II.4 Procedimiento para la purificación del AH contenido en el CAH.	38
II.5 Caracterización química del AH purificado.	39
II.5.1 Determinación cualitativa y cuantitativa de las diferentes unidades monosacáridicas presentes en el AH.	39
II.5.2 Determinación del contenido de ácidos urónicos.	40

	Pág.
II.5.3 Ensayo cuantitativo de hexosaminas.	40
II.5.4. Determinación de lípidos totales.	40
II.5.5 Determinación de la humedad residual.	41
II.6 Caracterización química física del AH purificado.	41
II.6.1 Determinación de la viscosidad cinemática.	41
II.6.2 Determinación del contenido de AH mediante el empleo de la cromatografía líquida de intercambio iónico.	41
II.6.3 Determinación de la masa molar del AH por cromatografía de exclusión molecular.	42
II.6.4 Determinación de la presencia de nucleótidos y proteínas.	43
II.6.5 Análisis cualitativo de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina en el AH purificado.	43
II.6.6 Caracterización mediante espectrofotometría de absorción infrarroja y de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C y Resonancia Magnética Nuclear bidimensional $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ en el ácido hialurónico.	44
II.7 Caracterización del etanol residual que queda de la obtención del CAH.	46
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	49
III.1 Caracterización del cordón umbilical residual	49

	Pág.
III.2 Aislamiento y caracterización del ácido hialurónico crudo (CAH) obtenido a partir de cordones umbilicales y cordones residuales.	52
III.3 Análisis de la relación ácidos urónicos / proteínas ($R_{au/prot.}$) en las etapas principales de la extracción empleando cordones residuales como materia prima.	58
III.4 Purificación y caracterización del AH.	58
III.5 Análisis químico del AH purificado.	61
III.5.1 Caracterización organoléptica.	61
III.5.2 Determinación cuantitativa de hexosaminas.	61
III.5.3 Determinación de ácidos urónicos.	61
III.5.4 Determinación de la presencia de lípidos totales.	62
III.6 Caracterización químico-física del AH purificado.	62
III.6.1 Determinación del contenido de nucleótidos y proteínas mediante mediciones espectrofotométricas.	62
III.6.2 Viscosidad cinemática.	63
III.6.3 Determinación de la masa molar del AH purificado.	64
III.6.4 Análisis por cromatografía de intercambio iónico.	65
III.6.5 Análisis cualitativo de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina en AH purificado, por cromatografía de papel.	66
III.7 Análisis estructural del ácido hialurónico purificado. Empleo de técnicas IR y de la Resonancia Magnético Nuclear ^{13}C - 1H .	67

	Pág.
III.7.1 Espectroscopia infrarroja.	67
III.7.2 Análisis de los resultados obtenidos mediante la espectroscopia de la Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C.	68
III.8 Estudios de estabilidad del CAH.	71
III.9 Análisis del etanol residual que queda después de la precipitación del ácido hialurónico como fuente de AH de baja masa molar.	74
III.10 Discusión general de los resultados	77
III.11 Aplicaciones generales del CAH, AH purificado y el alcohol residual que queda de la precipitación del CAH.	84
III.12 Contribución a la evaluación del efecto económico al introducir el procedimiento de obtención de AH en forma de CAH y el etanol residual a nivel de laboratorio.	85
IV. CONCLUSIONES	89
V. RECOMENDACIONES	90
VI. AUTOBIBLIOGRAFIA	
VII. REFERENCIAS	
VIII. ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

Au	Ácidos urónicos.
AH	Ácido hialurónico.
A ₂₆₀	Absorbancia leída a 260 nm.
A ₂₈₀	Absorbancia leída a 280 nm.
A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Relación de lecturas de absorbancia a 260 y 280 nanómetros.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AN	Ácidos nucleicos.
Az.Red	Azúcares reductores.
Au (bs)	Ácidos urónicos base seca.
BSA	Albúmina bovina.
BTAC	Cloruro de benziltrimetilamonio.
β-(1→3)	Simboliza el enlace glicosídico en posición beta entre el carbono anomérico uno en este caso del ácido glucurónico y el carbono tres de la N-acetilglucosamina.
β-(1→4)	Simboliza el enlace glicosídico en posición beta entre el carbono anomérico uno en este caso de la N-acetilglucosamina y el carbono cuatro del ácido glucurónico.
CAH	Crudo de ácido hialurónico.
CCR	Campo centrífugo relativo.
CD- 44	Receptores del ácido hialurónico.
CECMED	Centro estatal para el control de medicamentos.
CENPALAB	Centro nacional para animales de laboratorio.
CHP	Centro de Histoterapia Placentaria.
CMC	Carboximetilcelulosa.
col. mL ⁻¹	Colonia por mililitro.

CPC	Cloruro de cetilpiridinio.
cst	Unidades de viscosidad cinemática en centistokes.
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio.
CTAB-AH	Complejo de bromuro de cetiltrimetilamonio con el ácido hialurónico.
CTAB-AN	Complejo de bromuro de cetiltrimetilamonio con los ácidos nucleicos.
DEAE	Dietilaminoetil.
DNF	2,4 Dinitrofenol.
ELCBA	“Enzyme Linked Carbohydrate Binding Assay” (Método enzimático específico para detectar carbohidratos en este caso ácido hialurónico).
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (Métodos generales inmunoabsorbentes).
Fig.	Figura.
Fn- f	Fibronectina.
FPLC	“Fast Protein Liquid Chromatographic” (Cromatografía líquida de alta eficacia para determinar proteínas y nucleótidos).
GAGs	Glucosaminoglicanos.
g. mol ⁻¹	Gramos por mol.
HPLC	“High Performance Liquid Chromatographic” (Cromatografía líquida de alta eficacia).
ICAM- 1	Molécula de adhesión intercelular.
IFAL	Instituto de Farmacia y Alimentos.
IL-1β	Interleukina 1- β.
IR	Infrarrojo.
K _{av}	Constante basada en la relación entre (Ve-Vo) / (Vc-Vo) donde Ve es el volumen de elusión Vc el volumen de cama y Vo el volumen muerto.
K _d	Constante basada en la relación (Ve-Vo) / (Vf-Vo) en este

	caso Vf es el volumen final de menor masa molar.
MAC-1	Molécula de adhesión intercelular.
MH z	Unidades de frecuencia en megahercios.
mmol. L ⁻¹	Unidades de concentración en milimoles por litro
M ² S ⁻¹	Unidades de viscosidad de metros cuadrados por segundos.
μg. μL ⁻¹	Unidades de concentración en microgramos por microlitros.
mg. mL ⁻¹	Unidades de concentración de miligramos por mililitro.
nm	Unidades de longitud de onda en espectrofotometría de absorción ultravioleta expresada en nanómetros.
pa	Puro para análisis.
ppm	Unidades de concentración expresada en partes por millón.
R	Contenido porcentual de ácido hialurónico y otras sustancias.
Red (t)	Contenido de reductores en función del tiempo.
Readel De Haen	Firma que comercializa reactivos.
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear ¹³ C.
RMN- ¹³ C- ¹ H	Resonancia magnético nuclear bidimensional de carbono trece y protónica.
RHAMM	Receptores de la motilidad mediada por hialuronato.
RMMAH	El receptor para la motilidad mediada por hialuronato.
scans	Son los números de caídas de inducción en rmn C-13.
SCh	Sulfato de condroitina.
SH	Sulfato de heparina.
SQ	Sulfato de queratina.
Tr (rel)	Tiempo de retención relativo.
Tr	Tiempo de retención
TNF-α	Factor de necrosis tumoral.
UFC. mL ⁻¹	Unidades formadoras de colonia por mililitro.
UV	Ultravioleta.
UA	Unidades de absorbancia.
X	Promedio.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha notado un interés creciente en el ámbito mundial, sobre las investigaciones en el campo de las sustancias poliméricas a partir de fuentes naturales. En la industria médico-farmacéutica y cosmética, muchos de estos compuestos tienen numerosas aplicaciones tanto como sustancias auxiliares en la elaboración de diferentes medicamentos, así como también desde el punto de vista terapéutico. Entre estos materiales poliméricos se encuentra el ácido hialurónico (AH) y otros polisacáridos que conforman una gran familia de biomateriales conocidos como glucosaminoglicanos (GAGs). El AH es por su naturaleza un carbohidrato no reductor y forma parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. Es un heteropolisacárido de elevada masa molar (M) formado por unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, constituido por una unidad repetitiva $[-4)-\beta\text{-D-glucuronopiranosil-}\beta(1\text{---}3)\text{-2-acetamido-2-dexosi-D-glucopiranosido-(1)]$. Su masa molar puede llegar a valores en el orden de 1×10^7 g. mol⁻¹ aunque se han encontrado fracciones de 3×10^4 hasta 5×10^4 g. mol⁻¹ de interés terapéutico. La masa molar sin embargo, puede variar según el procedimiento de aislamiento y purificación. En años recientes se presenta un método de obtención de fracciones hasta 5×10^3 g.mol⁻¹ con un bajo índice de polidispersión, basado en el tratamiento combinado del AH de elevada masa molar con ultrasonido y con el empleo de hipoclorito de sodio o el uso de impelentes con

esfuerzo cortante, que mediante degradación mecánica puede reducirlo hasta $5 \times 10^3 \text{ g.moL}^{-1}$ (Yamaguchi, 1995; Callegaro y Renier, 2000).

Existen dos grandes tendencias mundiales para el aislamiento de AH y otros polisacáridos con actividad biológica que son la obtención de éste a partir de fuentes naturales como las crestas de gallo, el cordón umbilical humano, glándula submaxilar bovina, la zona de maduración de los condrocitos y los métodos fermentativos empleando microorganismos del género *Streptococcus zooepidemicus*. De éstos últimos, los más novedosos se basan en la inmovilización de células o enzimas, en la que el componente activo como es el microorganismo se encuentra microencapsulado, produciendo AH de alta masa molar en condiciones adecuadas de pH, temperatura, agitación etc (Danishevsky y Bella, 1966 ; Balazs, 1979 ; Devaraj y col, 1992 ; Sunwoo y col, 1998).

En el caso que se discute en este trabajo, el problema principal radica en proponer una metodología para el aprovechamiento de los cordones umbilicales residuales, generados como subproducto de la elaboración del Gel Fotoprotector y obtener a partir de esta fuente no informada en la literatura AH, así no se presenta competencia entre productos de una misma fuente. De esta forma, se contribuye al aprovechamiento de los residuales que constituyen una línea importante de desarrollo, porque se hacen más eficientes los procesos y permite con esto elaborar producciones biofarmacéuticas limpias.

El estudio de los cordones umbilicales humanos como fuentes de obtención y los procedimientos de aislamiento de AH, permite presentar la siguiente **hipótesis**

de trabajo. “El cordón residual que queda como subproducto de otras producciones biofarmacéuticas puede ser una fuente alternativa de obtención de AH”.

Para poder aceptar o refutar esta hipótesis se presenta el siguiente objetivo general:

Desarrollar una metodología de obtención de AH, a partir de los cordones umbilicales generados como subproducto de otras producciones biofarmacéuticas.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

1- Obtener una materia prima cruda (CAH) que contiene AH, a partir de cordones umbilicales humanos residuales y comparar ésta con el CAH obtenido a partir de cordones umbilicales humanos.

2- Purificar y caracterizar el AH presente en el CAH, que permita demostrar la presencia de AH, estudiar sus características estructurales y las posibilidades de su empleo.

3- Aprovechar el AH presente en el etanol recuperado de la precipitación de este polisacárido, en su proceso de obtención. Evaluar las potencialidades de éste en formulaciones farmacéuticas y cosméticas.

Las **tareas** para dar cumplimiento a estos objetivos fueron:

1- Desarrollar un método de obtención de un CAH, aprovechando los restos de cordones umbilicales empleados en la elaboración del Gel Fotoprotector y comparar éste CAH, con el logrado con los cordones umbilicales humanos, para ser evaluado en la industria biofarmacéutica y cosmética.

2- Caracterizar los CAH obtenidos, mediante métodos químicos.

- 3- Estudiar la estabilidad química y fisicoquímica del CAH.
- 4- Desarrollar un método de purificación del AH contenido en el CAH, demostrar su calidad ó pureza mediante la caracterización química y espectroscópica tanto por absorción ultravioleta (UV), infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear RMN ^{13}C y RMN $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$.
- 5- Caracterizar el etanol residual producto de la precipitación del CAH por métodos químicos y fisicoquímicos. Evaluar su potencialidad de empleo como materia prima en la fabricación de medicamentos y cosméticos.

Novedad Científica

Los aspectos novedosos del trabajo comprende:

- 1- La obtención, purificación y caracterización por primera vez de AH, a partir de cordones umbilicales humanos ya empleados para extraer otros principios activos y que aún son utilizables.

Importancia teórica

La **importancia teórica** del trabajo consiste, en poder aislar AH biológicamente activo a partir de una fuente que ha sido previamente tratada con solventes orgánicos. Los cordones umbilicales humanos residuales pueden ser almacenados a temperatura ambiente no provocando la degradación del AH presente.

Importancia práctica

La **importancia práctica** del trabajo, radica en el aprovechamiento de un material residual que anteriormente se botaba y que aparentemente, no tenía otro uso y

que ahora se convierte en materia prima para la producción de AH sin detrimento ó competencia en la obtención de otros productos a partir de la misma fuente. Otro aspecto de relevancia práctica lo constituye el procedimiento de obtención y uso de AH de baja masa molar a partir de etanol residual.

La tesis está estructurada en ocho capítulos que son: Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Autobiografía relacionada con el tema, Referencias Bibliográficas y Anexos.

Este trabajo forma parte de doce publicaciones. De éstas, diez se encuentran en revistas cubanas e internacionales y dos Registros Sanitarios (anexos).

A partir de los resultados se han logrado dos tesis de diploma de estudiantes del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) y una tesis del Politécnico de Química Mártires de Girón, se han expuesto en forma de cartel o exposición oral en eventos Internacionales, seis en forma de cartel y siete mediante exposición oral, los que se recogen en los libros de resúmenes y además en el XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica (Lago y col, 2003).

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El presente capítulo tiene como objetivo, brindar una panorámica de los principales métodos de aislamiento y purificación del AH, a partir de diferentes fuentes de obtención y discutir las principales ventajas o inconvenientes de éstos. Se analizan además, las características estructurales del AH y su influencia en sus diferentes funciones biológicas, las cuales permiten su uso, principalmente como medicamento, en la industria médico farmacéutica como por ejemplo en oftalmología, ortopedia y dermatología así como en la producción dermocosmética.

I.1 Características estructurales.

Los carbohidratos cubren la superficie de las células vivas en la forma de diversos glicoconjugados. Éstos, presentan estructuras muy variadas asociada a una diversidad funcional (Angeloni y col, 2005). Entre éstos se encuentra el AH [-4)- β -D-glucuronopiranosil- β (1—3)-2-acetamido-2-dexosi-D-gluco piranosido-(1], el cuál se considera un heteropolisacárido por poseer dos unidades monómeras diferentes.

Su unidad estructural fue definida por Weissman y Meyer (1954) y está constituida por el ácido D-glucurónico y la N-acetilglucosamina unidas en una estructura dimérica formada por enlaces β -(1→3) y β -(1→4) (Fig.1).

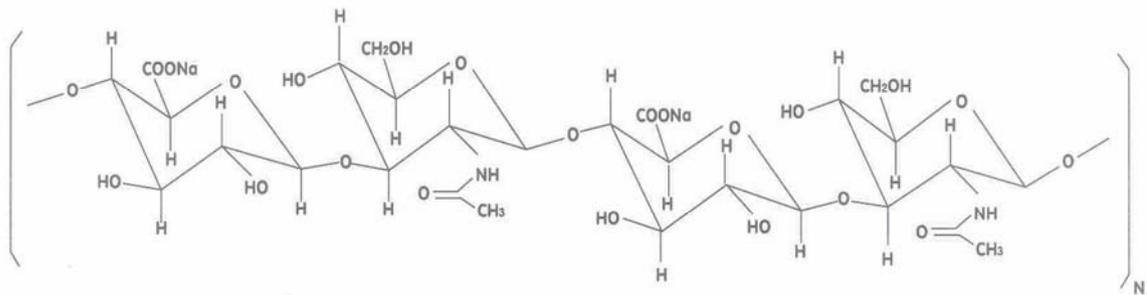


Figura 1. Estructura general de la unidad dimérica del ácido hialurónico en la que se observa al ácido glucurónico enlazado a la N-acetilglucosamina mediante enlace β -(1 \rightarrow 3) y esta unidad dimérica no reductora a la otra unidad mediante enlace β -(1 \rightarrow 4).

Se ha demostrado mediante estudios de resonancia magnético nuclear (RMN), microscopía electrónica y difracción de rayos X, que el AH posee estructura primaria, secundaria y terciaria (Scott y Heatley, 1999). La estructura primaria está dada por la secuencia monosacáridica del dímero constituido entre el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina. La estructura secundaria, se establece por las interacciones intramoleculares mediante puentes de hidrógeno (5 en total), provocando que la cadena lineal del polisacárido se tuerza y forme una doble hélice y la estructura terciaria está caracterizada por tres posibles puntos de contacto intermolecular que son: 1) cadenas antiparalelas unidas a grupos hidrófobos, 2) cadenas paralelas mediante interacciones por puentes de hidrógeno y 3) cadenas entrecruzadas por interacciones por puentes de hidrógeno e interacciones con los posibles centros hidrófobos (Mikelsaar y Scott, 1994; Nagorski y col, 1995). Estos tipos de interacciones, pueden explicar la gran mayoría de las propiedades asociadas a este polisacárido como son: viscoelasticidad, poder hidratante, cicatrizante y antiinflamatorio, así como una barrera que dificulta la difusión de los gérmenes, por lo que se le atribuye propiedades bacteriostáticas.

La masa molar del AH, oscila de $5,0 \times 10^5$ hasta $8,0 \times 10^6$ g.mol⁻¹ y en algunos casos se informa que puede llegar a $1,3 \times 10^7$ g.mol⁻¹ en dependencia de la fuente de procedencia, del método de aislamiento y purificación además de los procedimientos de determinación. Esta masa molar, puede influir en su acción cicatrizante. Algunos autores refieren que en las fracciones de masas molares $\leq 5 \times 10^5$ g.mol⁻¹, se presenta una acción cicatrizante superior (Jeanloz, 1970;

DellaValle y col, 1995; Callegaro y Romeo, 1997). Sin embargo, otros efectos biológicos de interés, como son su acción lubricante y su acción antiinflamatoria no se mantienen (Jourdan, 1979; Karen y Ellington, 1994; Nakamura y Nishida, 1994; Vercruysse y col, 1994). Lo anterior explica la importancia de elaborar un procedimiento adecuado para el aislamiento de AH de diferentes fuentes biológicas para obtener altos rendimientos y poca degradación.

Como se plantea, el poder hidratante del AH esta relacionado con su estructura. En los tejidos se manifiesta, al formar redes poliméricas comportándose como un medio gelatinoso que sirve de base para las funciones tisulares (Balazs, 1981; Balazs y col, 1991; Neidhart y col, 2000; Angeloni y col, 2005). Estas redes poliméricas, tienen la posibilidad de retener agua en su interior como si fuera una esponja molecular. En el caso de la piel, es responsable de su capacidad hidratante (Muir y Hardigan, 1975; Balazs, 1981; Balazs y col, 1991; Casero, 1994; Holbeck y Petillo, 1994; Nakamura y Nishida, 1995; Neidhart y col, 2000).

Se ha demostrado que cuando se aísla de fuentes biológicas o se obtiene por vía biosintética, la capacidad de hidratación del mismo, permite formar soluciones con características viscoelásticas (Balazs, 1981), de interés en oftalmología. Según algunos investigadores esta propiedad es única de esta estructura (Balazs, 1981; Casero, 1994).

A diferencia de otros proteoglicanos, el AH, a pesar de contener en su estructura algunas zonas hidrofóbicas, constituidas por grupos CH (Scott y Heatley, 1999), no se une de forma covalente a las proteínas, aunque se plantea que puede interactuar con algunas muy específicas de las membranas como los receptores

CD-44, el receptor para la motilidad mediada por hialuronato (RHAMM), así como la molécula de adhesión intercelular (Sherman y col, 1994; Alam y col, 1995). Otros polisacáridos pertenecientes a esta familia, si pueden asociarse mediante enlaces covalentes con las proteínas, como son el sulfato de condroitina (SCh), sulfato de heparina (SH) y el sulfato de queratina (SQ), etc (Muir y Hardigan, 1975; Pruet y col, 1979; Vercruyssen y col, 1994; Ponting y Kumar, 1995; Kainulanen y col, 1998; Takeda y col, 2004). Estas propiedades de asociación con las proteínas, debe tenerse en cuenta al abordar un procedimiento de purificación.

El AH, tanto a nivel de tejido como cuando se encuentra libre puede ser degradado por diferentes vías: enzimáticas, por acción de agentes químicos, radiaciones ionizantes, por acción mecánica, el ultrasonido y por efecto de la temperatura.

La enzima hialuronidasa testicular, cataliza la hidrólisis de los enlaces β -(1 \rightarrow 4) del AH. Esto viene acompañado de un descenso de la viscosidad y por tanto de su masa molar (Nakamura y Nishida, 1994). Sin embargo la llamada hialuronidasa de sanguijuela escinde el enlace D-glucosidurónico β -(1 \rightarrow 3) y la unidad más pequeña que se obtiene en esta hidrólisis es un tetrasacárido que posee el ácido urónico en el extremo reductor. Esta enzima es específica para el AH y no degrada otros GAGs, por esta razón se puede emplear en la identificación del mismo (Jeanloz, 1970; Pape, 1980; Yokoboric y col, 1995). Otras, como la hialuronato glicanohidrolasa, de veneno de reptiles e insectos, rompe el enlace aminodeoxihexosídico y se obtienen oligosacáridos de inferior masa molar

(Jeanloz, 1970; Jourdan, 1979; Pape, 1980; Lazenby y Brooker, 1981; Mikelsaar y Scott, 1994; Yokoboric y col, 1995; Agreen y col, 1997).

El AH se puede degradar también por agentes oxidantes y radiaciones UV y gamma, produciéndose radicales libres en la molécula de AH, que le permite inhibir algunas sustancias proinflamatorias como son interleukinas (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α), esta inhibición puede explicar, el efecto antiinflamatorio y analgésico del mismo (Schubert y col, 1981; Balazs, 1983; Mergulin y col, 1993; Rehakova y col, 1994).

La degradación por efecto de la temperatura se produce principalmente en solución, a temperaturas mayores de 25°C por más de seis horas (Karen y Ellington, 1994).

Los análisis estructurales del AH mediante técnicas de RMN, difracción de rayos X y microscopía electrónica han establecido algunas consideraciones acerca de la molécula de AH.

1. Existen diferencias de potencial en la flexibilidad entre los ángulos de enlace para el enlace β -(1 \rightarrow 3) y los dos valores encontrados para el ángulo del enlace β -(1 \rightarrow 4) (Holbeck y Petillo 1994).
2. El AH presenta una estructura espacial helicoidal de doble helice (Scott y col, 1984).

I.2 Funciones biológicas del ácido hialurónico.

EL AH se caracteriza por su ubicuidad, se encuentra localizado, en diferentes tipos de tejidos en el ser humano: en la piel, en las membranas corioamnióticas, en el fluido sinovial, en el cordón umbilical humano, en los tejidos de los cartílagos, humor vítreo, en las células dendríticas etc. (Itokasu y Matsunaga, 1995 ; Ponting y Kumar, 1995; Marshall y col, 2000).

El AH tiene una estructura que exhibe una amplia gama de efectos biológicos, dada por su capacidad hidratante, acción antiinflamatoria, cicatrizante etc (Balazs y Band, 1984; Barry, 1990; Nakamura y Nishida, 1995; Yokoboric y col, 1995). Durante la última década se ha demostrado que participa en un grupo de eventos que contribuyen en el comportamiento y fisiología de las células tales como: movimiento, crecimiento, división y diferenciación, remodelación del tejido, inflamación y tumorigénesis. Como se explicó con anterioridad, el AH no forma enlace covalente con las proteínas sin embargo, las células responden directamente al AH por medio de proteínas de la superficie de la membrana, que se unen al mismo mediante interacciones no covalentes, éstas son: las hialoheterinas, el receptor CD-44, el receptor para la motilidad mediada por hialuronato (RHMAH), el cual juega un papel importante en la motilidad de las células malignas, así como la molécula de adhesión intercelular (MAC-1). De los anteriores, el receptor CD-44 de gran especificidad hacia el AH, es una proteína integral de la membrana la cual está implicada, con la regulación del desarrollo de

tumores y con el potencial metastático (Murray, 1992; Sherman y col, 1994; Alam y col, 1995; Brismar, 1995; Nakamura y Nishida, 1995; Liu y Sy, 1997; Tufvesson y Westergren, 2000; Blass y col, 2001; Savani y col, 2001; Karvinen y col, 2003; Oba y col, 2003; Gao y col, 2004; Maytin y col, 2004; Takeda y col, 2004).

Entre los mecanismos de acción del AH en la cicatrización, está su interacción con el fibrinógeno, acelerando el proceso de formación del coágulo de fibrina inducida por la trombina. Aunque el nivel de AH es bajo en sangre, el mecanismo explica el significado funcional y estructural de este polisacárido durante la cicatrización (Weigel y col, 1988).

Se han encontrado nuevos mecanismos, que explican la acción del AH en los procesos de cicatrización. El AH se une a la molécula de fibronectina y estimula la migración epitelial en los cuales también participan los receptores celulares CD-44 migrando a la misma región, éstos son los mayores receptores para el AH, enlazándose específicamente con el mismo (Bertheim y Helltrom, 1994 ; Oksala y col, 1995; Lesley y col, 1997).

Existen preparaciones con fines cicatrizantes donde el principio activo es el AH. Ejemplo de éstas, es el Pandermin una crema al 0,1% p/p de AH, el cual se utiliza en el tratamiento de procesos reparadores tisulares de curso clínicamente tórpido, como úlceras varicosas, postulares y tróficas diabéticas, en cicatrices quirúrgicas y en quemaduras (Bertheim y Helltrom, 1994; Brismar, 1995; Della Valle y col, 1995; Termeer y col, 2000).

El AH presente en el fluido sinovial, se sintetiza por los condrocitos articulares a nivel intracelular, mediante la acción de la enzima hialuronato sintasa (Hascall,

2000). La presencia de este polisacárido es el responsable, de la alta viscosidad de éste, contribuyendo a la flexión de las articulaciones. Por la elevada masa molar y sus características estructurales, el AH muestra un efecto analgésico y antiinflamatorio ya que cubre la superficie de los receptores del dolor y actúa sobre los radicales libres que pueden aparecer por desequilibrios metabólicos con el envejecimiento o por algún trastorno en la articulación (Itokasu y Matsunaga, 1995; Marshall y col, 2000; Chenevier y col, 2004).

En la piel, el AH está vinculado con la defensa del organismo, al formar parte de la barrera química, impidiendo la penetración o el desarrollo de microorganismos o partículas extrañas y participa en la reparación de la misma.

I.3 Usos generales del ácido hialurónico.

La piel es una estructura muy rica en AH, se localiza en la epidermis a concentraciones normales de $90 \mu\text{g.g}^{-1}$ de peso seco promedio (Tammi y col, 1991; Hascall, 2000), donde está firmemente unido al colágeno y a los filamentos de queratina y sintetizado en los queratinocitos (Bertheim y Helltrom, 1994). Por lo que su empleo en la piel dañada por diferentes causas ha tenido una respuesta positiva como cicatrizante e hidratante.

El AH de elevada masa molar tiene la propiedad de mantener la piel hidratada y junto al colágeno constituyen una barrera protectora a las agresiones del medio. Con el envejecimiento, las células que producen AH se atrofian y la capacidad hidratante de la piel se afecta por lo que es de interés el desarrollo de dermocosméticos en forma de geles o cremas que permitan mantener la piel hidratada y evitar otros posibles daños por acción de las radiaciones solares, de

ahí la importancia de este polisacárido (Balazs, 1981; Ladisla, 2000). En la tabla I se presentan algunos usos del AH y sus derivados en piel.

El AH puede ser empleado además en oftalmología (Tabla II), ortopedia (Tabla III) y en otros usos tales como: diagnosticador, tratamiento de algunos tipos de cáncer, enfermedades vaginales etc (Tabla IV)

I.4 Aislamiento, purificación y caracterización de ácido hialurónico.

I.4.1 Métodos de aislamiento.

Existen dos grandes tendencias en el mundo para el aislamiento del AH, que pueden ser clasificadas en: obtención por vía enzimática y a partir de fuentes naturales.

Dentro de los métodos de obtención por vía enzimática, se conoce el procedimiento basado en la inmovilización de células, en la cual el microorganismo (*Streptococcus*) se encuentra microencapsulado en un medio de cultivo adecuado, en el cual se logra obtener AH de masa molar $\geq 6 \times 10^6$ g.mol⁻¹ (Armstrong y Johns, 1997). En años más recientes aparecen los métodos fermentativos con el empleo del *Streptococcus hemolíticus A* y *C* y los trabajos de ingeniería genética en la que se logra un mutante del *Streptococcus zooepidemicus* con posibilidades de empleo para la biosíntesis de AH. En estos casos se obtiene un AH de elevada masa molar que puede ser purificado mediante precipitación con la adición de etanol (Park y col, 1998; Poli y col, 1998; Shidlin y col, 2004).

Tabla I. Principales usos del AH en algunos trastornos de la piel y como dermocosmético.

Producto	Aplicaciones	Referencias
Producto obtenido mediante uniones o entrecruzamiento de AH con cationes poliméricos.	Aumenta sus efectos humectantes y suavizantes.	Colin y col, 1995 ; Tuyen, 1997
AH polisulfatado.	Se emplea en necrosis tumoral, favoreciendo el desarrollo de células endoteliales.	Tuyen, 1997 ; Barbucci, 2000
AH en forma de cremas.	Se emplea en el tratamiento del Escleroderma Sistémico Localizado.	Tajima y Yamada, 1995

Tabla II. Principales usos del AH en oftalmología.

Aplicaciones	Acciones biológicas	Referencias
Transplante de córnea	Previene dislocaciones postoperatorias del injerto.	Lima y col , 1999;Gómez y col , 2004
Operaciones de catarata	Reduce las complicaciones quirúrgicas y protege el endotelio. Reduce el edema de la córnea.	Lym y col , 2004
Implante de lentes intraoculares	Protege el endotelio corneal	Pape , 1980 ; Lazenby y Brooker, 1981
Prótesis	Se emplea como lubricante en prótesis del bulbo ocular.	Santocano y Ceccarini, 1994
Síndrome de ojo seco	Se emplea el AH en solución salina isotónica o propilenglicol.	Macnugth, 2001
Trabeculectomía	Se aplica en forma de hidrogeles entrecruzados, creando la viscosidad adecuada, dentro de la subconjuntiva.	Shaji y col , 2004
Cirugía de la retina	Las soluciones al 1% ayudan a la manipulación de la retina en los procesos quirúrgicos.	Alguere , 1971
Cirugía oftálmica general	Sustituto del humor vítreo	Pruett y col , 1979
Córnea	Efecto biomecánico en el estrato corneal	Tanimoto y col, 2004
Cirugía de córnea	Acción antiinflamatoria y biomecánica	Pape, 1980; Polack y col, 1981; Stegmann y Miller, 1981; Polack, 1982; Lym y col, 2004.

Tabla III Principales usos del AH en ortopedia.

Aplicaciones	Acciones biológicas	Referencias
Osteoartritis de la rodilla de cadera y la periartrosis del hombro	Lubricante, antiinflamatorio y analgésico	Homandberg y col, 1997; Tuyen, 1997; Brund, 2000; Ladisla, 2000; Rosier, 2000; Wen, 2000; Glenn, 2002 Suzuki y Ishigaki, 2002; Bery y Olsson, 2004; Coutts y Waddell, 2004; Hascall y col, 2004; Jay 2004 ; Kelly y col, 2004.

Tabla IV. Otros usos del AH como diagnosticador y medicamento.

Aplicaciones	Usos	Referencias
Como diagnosticador	<p>Detección de carcinomas gástricos.</p> <p>Determinación de la capacidad fecundante de semen humano.</p> <p>Marcador serológico en pacientes con cirrosis y fibrosis hepática.</p>	<p>Coward, 2000</p> <p>Blanco , 1994</p> <p>Saltik-Temizel y col, 2004; Tsukamoto y col, 2004.</p>
En el tratamiento del cáncer.	<p>Tratamiento del cáncer de mama y otros tumores malignos, combinando éste, con un medicamento anticancerígeno como es la Novantrona o la Mitosantrona, en forma de inyecciones intramusculares.</p>	<p>SOE, 2000</p>
En enfermedades vaginales.	<p>Se ha empleado de forma tópica, mediante el cambio de equilibrio de la flora bacteriana vaginal junto con el Bacilo de Doberlein, para la prevención y tratamiento terapéutico de daños causados por suministro de estrógeno.</p>	<p>Baldacci , 1998</p>
Desórdenes cardiovasculares.	<p>Tratamiento de los infartos o accidentes cerebrovasculares y en los daños de la isquemia en los tejidos.</p>	<p>Falk y col, 1994</p>
Cirugía.	<p>Previene la adhesión en superficies tisulares.</p>	<p>Golberg, 2000.</p>
Bronquitis crónica y el enfisema pulmonar.	<p>En forma de aerosoles actúa sobre las fibras elásticas protegiéndola</p>	<p>Verge,1996;Cantor, 2000</p>

El AH puede aislarse de varias fuentes naturales, convencionalmente se ha empleado el cordón umbilical humano y las crestas de gallo (Danishevsky y Bella, 1966; Balazs, 1979). Estas últimas, han tenido interés comercial por los rendimientos que se logran ($0,8 \text{ g.Kg}^{-1}$ de tejido). Se conocen de otras fuentes biológicas como pueden ser el humor vítreo, piel, extracto de glándula submaxilar bovina, células dendríticas (Sunwoo y col, 1998) y fluido sinovial (Kvan y col, 1993) en años recientes aparece informado el empleo de la pulpa dental de ratas (Shibata y col, 2000). Estas fuentes, son de poco interés comercial, debido a que el polisacárido se encuentra en bajas concentraciones, sin embargo en algunos casos como por ejemplo en el fluido sinovial, el aislamiento de AH permite medir trastornos como la artritis reumatoide que está asociada a un desbalance del contenido del mismo (Wannarat y col, 2003).

En el cordón umbilical humano, el AH se encuentra a concentraciones relativamente elevadas (0,04% p/p) (Kennedy, 2006), en comparación con otros tejidos. Éste se localiza principalmente en la llamada gelatina de Warton, que no es más que el tejido conectivo perivascular que protege al cordón umbilical y evita que éste se tuerza durante el embarazo (Botella y col, 1986; Ponting y Kumar, 1995). El cordón umbilical humano además de contener un 0,04% p/p de AH, contiene otros polisacáridos sulfatados en forma de proteoglicanos como son: el SH, SCh, SQ etc. (Danishevsky y Bella, 1966), y considerable cantidad de agua 88,9% p/p (Sloper y col, 1979) además de proteínas libres o asociadas que permiten ser utilizadas en la formulación del Gel Fotoprotector (Hollands y col, 2003).

En la tabla V se presenta la composición del cordón umbilical humano procedente de placentas a término, en cuanto a contenido de grasas totales, proteínas, agua, carbohidratos, ceniza y AH.

Entre los métodos de obtención, existen variantes por métodos físicos, que permiten obtener AH de masa molar $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ o quizás inferiores. Una de ellas se basa en el empleo de impelentes con superficie cortante, para producir AH de masa molar más baja (Yamaguchi, 1995) y recientemente los métodos ultrasónicos, combinado con la adición de hipoclorito de sodio, en los cuales se logra AH de masas molares 5×10^3 hasta $3 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (Callegaro y Renier, 2000). El empleo del ultrasonido con fines comerciales, encarece estos métodos de obtención, por el elevado consumo de energía.

En los métodos de aislamiento y purificación, es importante eliminar las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros polisacáridos. En la mayor parte de éstos, se puede afectar la molécula en su forma natural y la masa molar disminuir rápidamente. Esta es la razón por la cual, la preparación de AH con varios niveles de pureza y en tamaño molecular aproximado al natural, es extremadamente cara y difícil de obtener (Balazs y Band, 1984; Rehakova y col , 1994).

Los procedimientos de aislamiento, empleando baja resolución comprenden las siguientes etapas:

- Extracción.
- Eliminación de contaminantes (lípidos, proteínas y otros polisacáridos).
- Precipitación.

Tabla V. Caracterización del cordón umbilical humano.

Indicador	Valores obtenidos (Sloper y col ,1979) (g. (100 g)⁻¹)
Humedad	88,90
Sólidos totales	11,10
Grasa	0,12
Proteína	10,19
Carbohidratos	0,60
Cenizas	0,19
Ácido Hialurónico	0,04 (Kennedy, 2006)

Se han utilizado diferentes formas de extracción, desde soluciones de cloruro de sodio hasta el empleo del sulfato de amonio y el clorhidrato de guanidina (Devaraj y col, 1992; Sunwoo y col, 1998).

Algunos autores han desarrollado procedimientos, en el cual se combina el tratamiento del tejido con soluciones salinas y con el empleo de enzimas. Stacey y Barker (1962) describieron diferentes métodos con el uso de tripsina y quimotripsina, para separar las proteínas del AH sin afectar la viscosidad y con poca degradación del mismo. Sin embargo, otros autores plantean, que la extracción completa del AH del tejido, mediante el tratamiento previo del mismo con enzimas proteolíticas como la papaína, pronasa etc en presencia de cisteína y EDTA puede producir AH degradado, constituyendo una inconsistencia de estos métodos (Kvan y col, 1993; Nakano y col, 1994; Sherman y col, 1994). En 1966 Danishevsky y Bella desarrollaron un método para extraer polisacáridos sulfatados a partir de cordón umbilical humano, pero que brinda un subproducto rico en AH. El método, se basa en extracciones sucesivas con soluciones salinas de cloruro de sodio a diferentes concentraciones, quedando una fracción inicial soluble, que se obtiene con solución salina al $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ p/v que contiene AH, sin embargo están presentes algunos contaminantes como son proteoglicanos, ácidos nucleicos (AN) y proteínas. En el método descrito, el tejido se trata posteriormente con enzimas proteolíticas y el extracto resultante que contiene AH se mezcla con la solución salina $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ aislada en la primera etapa del proceso, por lo que, el procedimiento se encarece, al tener que utilizar métodos de alta resolución para su purificación. La técnica de Danishevsky y Bella (1966), utiliza además una sal

de amonio cuaternaria como el cloruro de cetilpiridinio (CPC) como agente precipitante de los polisacáridos, junto a proteínas, AN etc. lo cual es una limitación para su empleo o manipulación dada la toxicidad de éste (Garner y Papworth, 1977).

Los métodos de extracción y eliminación de contaminantes, están íntimamente relacionados. A los procedimientos de extracción, le siguen etapas de eliminación de contaminantes que pueden ser proteínas, lípidos y otros proteoglicanos. En algunos extractos, las proteínas se separan del AH mediante la adición de una mezcla de alcohol amílico-cloroformo. La extracción con esta mezcla de solventes, en extractos obtenidos, después de un tratamiento previo con pepsina y tripsina tiene el inconveniente que el AH aparezca mezclado con SCh ya que estas enzimas pueden romper la estructura de los proteoglicanos. El SCh, es una de las impurezas más comunes, puede ser separado de diferentes formas, una de las más conocidas, se basa en la adición de una solución saturada de sulfato de amonio con piridina (Stacey y Barker, 1962). El empleo de enzimas y de solventes como el alcohol amílico descrito anteriormente, encarece el método de obtención por los costos de las enzimas utilizadas, los solventes y la necesidad de implementar etapas de eliminación de éstos para la purificación del AH.

En años más recientes, se conoce del empleo del clorhidrato de guanidinio para extraer proteoglicanos y AH de diferentes tejidos. Esta sal permite que los proteoglicanos y el AH difundan fuera del tejido con mayor facilidad (Carney, 1986). En estas técnicas, se suelen utilizar inhibidores de proteasas como es el ácido 6-aminocaproico. La purificación de estos extractos, para obtener AH se ha

llevado a cabo mediante el uso de gradientes de centrifugación. Para esto, se suele adicionar a los extractos, una sal de cesio como puede ser CsCl que ayuda a la formación del gradiente, debido a que el ión cesio se enlaza a la carga negativa de los proteoglicanos y son más fáciles de separar. Estas técnicas requieren del empleo de una ultracentrífuga durante un tiempo de hasta 48 horas. Este procedimiento se ha aplicado en el aislamiento de AH a partir de glándula submaxilar bovina y del fluido sinovial. En estos casos tiene poco interés comercial por los bajos rendimientos ($20 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Devaraj y col, 1992; Kvan y col, 1993).

Para eliminar lípidos, puede emplearse geles hidrófobos como por ejemplo el Aerosil y para desproteínizar, además del empleo de la mezcla del alcohol amílico-cloroformo señalado anteriormente, se puede tratar el extracto, con mezclas de fenol en cloroformo, fenol/acetato de sodio o simplemente cloroformo (Balazs, 1979; Brun y col, 1990).

Uno de los procedimientos de aislamientos más conocidos, es el propuesto por Balazs (1979) en el que se plantea el uso de crestas de gallo como fuente natural de obtención. Este consta de 3 etapas generales, desglosadas en 35 pasos que se llevan a cabo durante 15 días por cada lote productivo. Estas etapas son: 1. Extracción 2. Desproteínización y 3. Precipitación.

En la primera etapa, el tejido se trata 4 veces en periodos de 24 horas cada una con mezclas de agua y cloroformo en una relación (20:1).

En la segunda etapa, la mezcla de los diferentes extractos, se desproteínizan tratando éstos 4 veces con similares volúmenes de cloroformo, respecto al

volumen de extracto y se separa y desecha, la fase clorofórmica e interfase. Esta se realiza en 10 pasos durante 20 horas.

En el tercer paso, se eliminan otras impurezas y se precipita el AH. Se realiza una última extracción, con similares cantidades de cloroformo, se agita por 5 horas y se deja en reposo por 5 días más, se desecha fase clorofórmica e interfase. A la solución acuosa resultante, se le adiciona 3 volúmenes de alcohol y el sedimento se resuspende en solución salina de cloruro de sodio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ y se le añade 3 volúmenes de etanol adicional. Esta operación se realiza 3 veces. Al final se vuelve a resuspender pero en solución salina $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ que contiene 1% de CPC y se precipita con 3 volúmenes de acetona.

El método tiene los inconvenientes siguientes :

- Son necesarios 15 días para procesar cada lote en 35 etapas.
- No se garantiza total eliminación de AN.
- Se emplea CPC que resulta tóxico (Garner y Papworth, 1977).
- Se emplean considerables volúmenes de solventes (cloroformo y etanol).
- No se caracteriza ni se aprovecha el alcohol residual, que puede contener fracciones de AH de baja masa molar.

La precipitación del AH, se facilita con el empleo de sales de amonio cuaternaria de alta masa molar como es el cloruro de cetilpiridinio (CPC) y el cloruro de benziltrimetilamonio (BTAC) (Schiller, 1961; Hildesheim, 1983) sin embargo no se conoce del empleo del CTAB como reactivo precipitante de polisacáridos que resulta menos tóxico.

El mecanismo de precipitación, se basa en la formación de complejos insolubles o poco solubles de los centros cuaternarios con carga positiva, con los grupos carboxilos libres del AH.

De otra forma se puede precipitar el mismo, por simple adición de etanol en presencia de sulfato de amonio (Casione, 1995).

I.4.2 Métodos de purificación, identificación y análisis.

Las técnicas de cromatografía líquida, son métodos de alta resolución de mayor empleo para la caracterización del AH, se utilizan para :

1. Lograr AH con una pureza superior, cuando el producto obtenido con un método de baja resolución, no alcanza la pureza adecuada para determinados usos.
2. Lograr cuantificar y caracterizar el AH.

En cuanto a las técnicas de detección, identificación y caracterización de AH además de otros polisacáridos, han sido muy variadas desde el empleo de detectores refractométricos, UV y fluorescentes en cromatografía líquida, técnicas colorimétricas, métodos enzimáticos simples o combinados, hasta el uso de técnicas de RMN ^{13}C , RMN ^{13}C - ^1H y la espectroscopia IR (Golbert, 1995; Mahoney y col, 2001).

Empleo de la cromatografía de afinidad.

Suzuki y Koide (1984) y más tarde Khademkossim y col (2004), desarrollaron una forma de separación mediante cromatografía de afinidad con el empleo de Sepharosa CI-4B acoplada a la poly-L-lysina. El extracto de origen natural, que contiene polisacáridos, se aplicó y cada fracción se caracterizó mediante análisis

de ácidos urónicos, aminoazúcares y sulfatos. En este sistema fueron eluidos los polisacáridos en el siguiente orden: AH, condroitina, SQ, SH, H y SCh con el grupo sulfato, sustituido en el carbono 4 y en el 6 de la fracción de hexosamina de este polisacárido. La cromatografía de afinidad puede ser de interés como técnica analítica, pero de poco interés en trabajos preparativos.

Uso de la cromatografía en fase reversa.

Se conocen trabajos de cromatografía en fase reversa, presenta como inconveniente que no es posible separar polisacáridos entre sí, debido a que éstos por su carga eléctrica, eluyen rápidamente a elevada fuerza iónica, no obstante permite separar los mismos de posibles contaminantes como péptidos, debido a que éstos, son muy difíciles de eliminar por técnicas preparativas clásicas a baja resolución, en cambio, Brun y col (1990), describieron una técnica de separación de polisacáridos y posibles péptidos aislados del fluido sinovial, empleando una columna de fase reversa tipo RP-6 modelo Supelcosil LC 318, utilizando un gradiente de fosfato con acetonitrilo. Aunque no se logra separar los polisacáridos entre sí, permite cuantificar éstos y las proteínas de baja masa molar.

Cromatografía de intercambio iónico.

Los métodos de intercambio iónico, han sido empleados por diferentes autores para la caracterización de GAGs y se logra una buena resolución que permite la separación del AH de otros polisacáridos, sobre todo de polisacáridos sulfatados. Se basan en la capacidad que presentan los intercambiadores iónicos para retener con mayor o menor fortaleza a los polisacáridos ácidos como son el SCh, SH, SQ y el AH. Debido a la presencia de grupos carboxilos o sulfatos en la estructura de

éstos. Estas técnicas, pueden desarrollarse de forma preparativa y es un método de control analítico para cuantificar la presencia de AH aislado y purificado por técnicas preparativas de baja resolución.

En la tabla VI, se presentan diferentes resinas empleadas para la purificación, identificación y cuantificación del AH, utilizando como técnicas auxiliares o complementarias, el uso de un estándar de referencia de AH, el empleo de la hialuronidasa de sanguijuela y los métodos electroforéticos (Mahoney y col, 2001; Göran y Rolf, 2003).

De la tabla VI, se observa que es muy común el empleo inicial, de la cromatografía de exclusión molecular para eliminar contaminantes no polisacáridicos y posteriormente el uso de la cromatografía de intercambio iónico. Entre los geles de exclusión molecular más comunes se encuentra el Sephadex G-50, que presenta un límite de exclusión de 5×10^2 a 10^4 g.mol⁻¹. Este gel permite la exclusión de los polisacáridos de elevada masa molar y retiene a los péptidos o fracciones de oligosacáridos de baja masa molar. Los polisacáridos eluidos por esta vía se separan mediante el empleo de resinas de intercambio débilmente aniónico (Nebinger, 1985).

Existen intercambiadores clásicos, como son las resinas Dowex 1-X2 y la 1-X8 que son fuertemente aniónicas, donde, los péptidos son los primeros en eluir, luego le siguen en ese orden el AH y después los otros polisacáridos (Danishevsky y Bella, 1966; Nebinger, 1985; Rehakova y col, 1994) .

Sunwoo y col (1998), obtuvieron el AH, de células dendríticas, mediante extracción con clorhidrato de guanidina. Las fracciones obtenidas después de aplicar un

Tabla VI. Cromatografía de intercambio iónico empleada en la separación y cuantificación de AH, tipos de soporte, requerimiento de los métodos.

Tipo de soporte	Requerimientos del método	Referencia
Nucleogen 4000-10 DEAE	Gradiente formado por A: formamida al 50%, KCL 0,1 mol. L ⁻¹ , triton X-100 0,05% y KH ₂ PO ₄ 0,1 mol.L ⁻¹ B: A y KCL 1 mol.L ⁻¹	Fedarko y col, 1990
Dowex 1-X2	Se eluye con solución salina 0,5-1,25 mol.L ⁻¹	Korn, 1959; Danishevsky y Bella, 1966 ; Rehakova y col, 1994.
Sephadex G-50 DE 52 DEAE	Se conectan dos columnas. La primera de filtración por gel, empleando solución de NaCl 0,15 mol.L ⁻¹ .La segunda con el empleo de un gradiente de solución de LiCl desde 0,2–1,2 mol.L ⁻¹ en buffer de acetato de sodio 0,05 mol. L ⁻¹	Nebinger, 1985
Sephadex G-50 Sephacil DEAE	Se eluye primero en columna de filtración por gel con NaCL 0,15 mol.L ⁻¹ y luego mediante gradiente 0-1mol.L ⁻¹ de ácido fórmico en intercambio iónico.	Nebinger, 1985
Dowex 1-X8	Se eluye con ácido acético y solución salina	Nebinger, 1985

gradiente de centrifugación, se purifican utilizando primero una columna de intercambio iónico DEAE–Sepharsa y posteriormente una de filtración por gel de Sepharsa Cl-4 B. Este gel, permite cuantificar la masa molar de las diferentes fracciones obtenidas mediante la cromatografía de intercambio iónico. La primera fracción contiene SCh de elevada masa molar ($>10^6$ g.mol⁻¹). La segunda fracción proteoglicanos con valores de masa molar intermedia y la tercera AH.

Cromatografía de exclusión molecular.

Los métodos para determinar la masa molar en solución de AH, pueden ser por medición de la presión osmótica, viscosimetría, difracción de la luz, sedimentación-difusión, pero los más utilizados, por la diversidad de soportes con diferentes grado de exclusión molecular y que permiten trabajar con diferentes solventes, son los métodos cromatográficos mediante filtración por gel o por combinaciones con otros métodos como son la ultracentrifugación (Pazur, 1986; Hagel y col, 1989). Para el desarrollo de estas técnicas, es necesario del empleo de patrones adecuados de polisacáridos, con el uso de detectores refractométricos. En la tabla VII se relacionan los soportes de mayor empleo para filtración por gel, informado en la literatura, en los cuales siempre se utilizan patrones de polisacáridos de la misma serie homóloga y masa molar conocida. En la actualidad se conoce, que las masas molares oscila entre 5×10^5 - 8×10^6 g.mol⁻¹, con un valor promedio en peso de 7×10^6 g.mol⁻¹.

Cromatografía de papel.

La cromatografía de papel, es una forma conocida que permite detectar AH a través de la identificación de los monómeros que constituyen la estructura de éste,

Tabla VII. Técnicas de exclusión molecular para determinar la masa molar en el AH.

Métodos	Tipo de soporte	Requerimientos del método
Orvisky y col, 1992.	SG-10-6000 NH ₂	Elusión con buffer fosfato 0,05 mol.L ⁻¹ . Detección a 206 nm.
Beaty y col, 1985.	TSK G 6000 PW	Elusión con solución salina de NaCL, 150 mmol.L ⁻¹ y solución de NaH ₂ PO ₄ 3 mmol.L ⁻¹ . Contienen 0,02% de NaN ₃
Motohashi y Mori, 1988.	Porasil	Se eluye con solución de NaCL 0,2 mol. L ⁻¹ a 25° C
Motohashi y Mori, 1988.	Shodex OH Pak B-806	Se eluye con solución salina de NaCL 0,02 mol.L ⁻¹ y se emplea detección refractométrica

con el empleo de patrones adecuados, en este caso ácido glucurónico y glucosamina. Previa hidrólisis ácida del polisacárido.

Como sistemas de solventes puede ser utilizado, una mezcla de n-butanol / piridina / HCL $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ o 2-propanol / acetona / ácido láctico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Como reveladores se ha informado el empleo de difenilamina / anilina / ácido Fosfórico, Naftoresorcinol /etanol / ácido sulfúrico, tetrazol azul y el empleo de sulfato cúprico amoniacal (Martin, 1986).

Cromatografía gas-líquido.

Las técnicas de cromatografía gas-líquido, aunque han sido de interés, en la identificación de las unidades monoméricas en diferentes polisacáridos, no se encuentran informadas en la literatura para la caracterización del AH. Se conoce del uso de derivados silanizados, aunque estos presentan el inconveniente de aparecer como mezclas de isómeros (Martin, 1986).

La cromatografía gas-líquido, permite determinar la posición de los enlaces glicosídicos a partir de los derivados metilados. Entre los métodos de metilación se encuentra la reacción de Hakamori, con posterior hidrólisis y acetilación. Sin embargo, no es recomendable para el AH, debido a que este polisacárido contiene ácidos urónicos y N-acetil hexosaminas en su estructura, que son más difíciles de metilar y pueden producir productos secundarios indeseables. Por ejemplo, las fracciones monosacáridicas de ácidos urónicos pueden dar derivados cetálicos por reacción del grupo carboxilo con el carbanión producido entre dimetilsulfóxido con hidruro de calcio o de sodio. Estos cetales pueden ocasionar reacciones de eliminación con la formación de productos indeseables. Algo similar ocurre con las

N-acetilhexosaminas produciendo derivados indeseables. Tales productos pueden requerir de técnicas mucho más complejas para su detección (Pazur, 1986).

Identificación del ácido hialurónico.

El AH se puede identificar por métodos electroforéticos, enzimáticos e inmunoenzimáticos, colorimétricos y físicos. Un método físico de gran aplicación es la detección refractométrica, pero es necesario que la muestra tenga un alto grado de pureza (Suzuky y Koide, 1984 ; Beaty y col, 1985; Orvisky y col, 1992; St.Ang, 2000).

Métodos electroforéticos.

Los métodos electroforéticos, permiten separar los diferentes componentes de una mezcla que contenga AH y otras sustancias. La electroforesis capilar, es una de las técnicas de mayor aceptación en los últimos años, éstas permiten separar, identificar y en algunos casos cuantificar el AH de diferentes extractos (Grimshaw y col, 1996 ; Hayase y col, 1997). Entre los primeros trabajos en este campo se encuentra el empleo de tiras de acetato de celulosa y un 10% p/p de gel de poliacrilamida, en éstos, se emplea alciano azul como revelador con un 2% p/v de ácido acético y el empleo de sales de cobre II en la cual se forman complejos coloreados con el AH y otros polisacáridos (Min y Cowman, 1986;Toida y Linhardt, 1996).

Entre otras membranas para electroforesis capilar, se conocen, las de nitrato de celulosa. En estos casos, las mezclas de AH y otros polisacáridos se separan previamente de otros contaminantes, mediante el empleo de geles de agarosa convencional. Para la identificación, se han empleado diferentes reveladores

como es el azore, azul de toluidina y el alciano azul (Volpi, 1996; Maccari y Volpi, 2002).

Métodos enzimáticos e inmunoenzimáticos de identificación.

Los métodos enzimáticos son variantes de alta especificidad que permite identificar al AH, en el caso de la hialuronidasa de sanguijuela, presenta como único sustrato el AH y para la identificación de éste, se incuba el material desconocido junto a la enzima, esto trae como resultado que aumente la motilidad del AH cuando se trata de separar mediante electroforesis capilar en acetato de celulosa, pues la hidrólisis disminuye la masa molar, si él está presente (Vercruyse y col, 1994 ; Nakamura y Nishida, 1995).

Existe una técnica inmunoenzimática por ELISA usando una enzima enlazadora del AH, la hialuronectina de cerebro humano (Delpech y col, 1985).

Dentro de los métodos de identificación inmunoenzimáticas, se conoce una técnica conocida por las siglas (ELCBA) (“Enzyme Linked Carbohydrate Binding Assay”) (Dolzhenko y col, 1994). La técnica está basada en la interacción de proteínas enlazadas a carbohidratos inmovilizados sobre una fase sólida con una enzima como es la glicosaminoglicanoperoxidasa. Los polisacáridos se determinan espectrofotométricamente después de la reacción enzimática con el sustrato cromogénico.

Métodos colorimétricos.

Otros métodos de aplicación son los colorimétricos (Carney, 1986; Montreuil y col, 1986) que se pueden utilizar en la detección del AH, aunque ninguno es específico para él. La mayor parte de éstos, se basan en la reacción de la fracción de ácidos

urónicos presentes en la molécula o de la N-acetilhexosamina. Estos métodos, permiten determinar de forma cualitativa y cuantitativa la presencia de estas unidades monoméricas (Tabla VIII).

Una forma rápida de identificación colorimétrica, consiste en la formación de coágulos cuando se añade al suero sanguíneo, alciano azul y un extracto que contenga AH procedente del fluido sinovial (Kutsch y Schleich, 1989).

De los métodos descritos en la tabla VIII, el método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen es uno de los más conocidos. Éste, está basado en la reacción del AH previamente hidrolizado con el metahidroxibifenilo con el objetivo de determinar los ácidos urónicos presentes en la molécula.

Se conoce un método basado en la reacción de la fracción de N-acetilhexosamina presente en el AH con el NN-dimetilaminobenzaldehído, conocido como procedimiento de Elson-Morgan (Carney, 1986) la cual, bajo condiciones adecuadas, permite el desarrollo de color y su lectura a 530 nm.

Otro método es el del carbazol, el cual reacciona con los ácidos urónicos. Sin embargo, las proteínas presentes en el medio pueden interferir el análisis, aunque se puede evitar con la introducción de iones borato. El ensayo es positivo cuando se produce un color púrpura y el contenido de ácidos urónicos se puede cuantificar a 530 nm.

El uso de la carbocianina es un método para la detección de AH, en presencia de polisacáridos ácidos se colorea de azul oscuro y se puede detectar leyendo a 510-660 nm (Kutsh y Schleich, 1989).

Tabla VIII. Métodos colorimétricos para la identificación cualitativa y cuantitativa de las unidades monosacáridicas del ácido hialurónico

Reacción con	Reactivo	Color	Referencias
Ácidos urónicos	MHDF	rojo	Montreuil y col, 1986. Martin, 1986.
	Carbazol	púrpura	
Aminodioxihexosas	Dimetilaminobenzaldehido	rojo púrpura	Carney, 1986.

Métodos de caracterización estructural.

Las técnicas de RMN permiten :

- Determinar la posición del enlace glicosídico.
- Determinar la secuencia de las unidades monosacáridicas presentes en la estructura del AH.
- Determinar los grupos sustituyentes unidos al esqueleto del AH.

Los estudios estructurales realizados al AH, indican que en él, existe una estructura primaria conformada por una unidad dimérica repetitiva. Sin embargo los ensayos realizados mediante técnicas de RMN ^1H y difracción de rayos X en tetra, hexa y octasacáridos a 300 y 500 MHz a través de los corrimientos químicos han establecido la presencia de una estructura secundaria que comprende cinco enlaces por puente de hidrógeno intramolecular de la unidad del tetrasacárido formando una doble hélice. Ésta posee de ocho a nueve zonas hidrofóbicas (CH) que pueden explicar la habilidad del AH para interactuar con lípidos y proteínas en las membranas. Se plantea que estos puentes de hidrógeno intramoleculares, pueden tener por tanto, un significado funcional en los tejidos (Scott y col, 1984; Heatley y Scott, 1988; Holbeck y Petillo, 1994; Scott y Heatley, 1999).

De los estudios efectuados por Scott y Heatley (1999) empleando técnicas de RMN ^{13}C realizadas con y sin el empleo de la enzima hialuronidasa testicular, han permitido esclarecer los principales corrimientos químicos de la estructura del esqueleto de la molécula de AH y de los carbonos del grupo carboxilo de la fracción monomérica del ácido glucurónico y del grupo carbonilo de la N-

acetilglucosamina, que caracterizan al AH en RMN ^{13}C . Es necesario destacar que el tratamiento con hialuronidasa testicular bovina, acorta la cadena del AH, al romper los enlaces β -(1 \rightarrow 4) formando oligosacáridos y se obtienen espectros de mayor calidad (Toffani y col, 1993). Los resultados, indican la presencia de una estructura terciaria más rígida. En ésta se ha demostrado que existen interacciones intermoleculares entre el grupo CO del carboxilo presente en el monómero ácido glucurónico y con el NH de la acetamida, formando verdaderas cadenas sobrelapadas antiparalelas. Éstas se pueden estabilizar por enlaces de hidrógeno específicos intramoleculares y posibles interacciones hidrofóbicas (Scott y Heatley, 1999).

De acuerdo a lo anteriormente planteado de las diferentes fuentes, el cordón umbilical humano es una de las más prometedoras, sin embargo las investigaciones en busca de nuevas fuentes que permitan mayores rendimientos de AH, es uno de los aspectos novedosos de interés en el campo de los carbohidratos, por el amplio espectro de uso de este polisacárido.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y METODOS.

El presente capítulo tiene como objetivo, describir el procedimiento empleado en la obtención de AH, en forma de un crudo (CAH) obtenido a partir de cordones umbilicales residuales, su caracterización, además de una descripción del procedimiento de purificación de este polisacárido (AH).

II.1 Caracterización del cordón umbilical residual empleado para la obtención del ácido hialurónico.

Durante el proceso de obtención de Gel Fotoprotector, queda un 30% de cordones residuales. Los mismos se caracterizaron mediante análisis de grasa, proteína, ceniza, carbohidratos y humedad (CIDEM, 1998). Esta fuente residual se comparó con el cordón umbilical humano en cuanto a sus características macroscópicas (consistencia, color etc.) y su composición química (Sloper y col, 1979; Kennedy, 2006).

II.2 Obtención de un crudo que contiene ácido hialurónico (CAH), a partir de cordones umbilicales convencionales y cordones residuales.

Considerando la información que se tenía de la bibliografía consultada, se realizó un diseño experimental, para el aislamiento de AH en forma de CAH, a partir de cordón umbilical residual, este método de extracción consta de las siguientes etapas:

- Extracción a partir del tejido.

- Adición de una sal de amonio cuaternaria.
- Ruptura del complejo formado entre la sal de amonio cuaternario con el AH, AN, proteínas etc. con solución de cloruro de sodio de mayor fuerza iónica.
- Precipitación del CAH con el empleo de etanol.

Procedimiento de obtención.

Se realizaron diferentes ensayos a nivel de laboratorio, para optimizar las condiciones de extracción y precipitación de un crudo que contiene AH (CAH).

Se tomó 1 Kg de cordones umbilicales residuales generados de la producción del Gel Fotoprotector. Éstos se mezclaron con 4 L de disolución de cloruro de sodio 0,2% p/v, debido a que esta relación masa / volumen de disolución salina, es la más adecuada, para lograr una buena extracción (Devaraj y col, 1992), empleando un agitador con un impelente tipo áncora de baja superficie cortante.

Para separar el tejido del extracto, se empleó una velocidad de centrifugación de 7000 gravedades utilizando una centrífuga refrigerada modelo Beckman JH-20.

Se realizaron diferentes ensayos, para optimizar las condiciones de extracción y precipitación del complejo formado, entre una sal de amonio cuaternario en este caso el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (un agente tensioactivo catiónico) en solución al 1% p/v, con una mezcla formada por AH, AN, proteínas y otros posibles GAGs (CTAB-mezcla). Esta sal acompleja a los GAGs, debido a que éstos se caracterizan por presentar carga eléctrica negativa, por la presencia de grupos carboxilos y sulfatos como son el SCh, SQ, SH etc, que pueden estar presentes en el cordón umbilical residual.

Se realizó un diseño experimental con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de extracción y de precipitación del AH con CTAB al 1% p/v, mediante un plan factorial 3^2 (3 niveles con 2 variables), se tomó en consideración como una de las variables el tiempo de extracción desde 8 ($X_1 = -1$) hasta 48 ($X_1 = +1$) horas (X_1 en forma de variable codificada) considerando las 24 horas como el tercer nivel del diseño ($X_1 = 0$) en el punto central.

Como segunda variable del diseño, se utilizó diferentes dosis de CTAB al 1% p/v desde 300 ($X_2 = -1$) hasta 900 mL ($X_2 = +1$) (X_2 en forma de variable codificada) y la dosis de 600 mL el punto ($X_2 = 0$) del diseño para esta variable. Se realizaron tres réplicas en el punto (X_1, X_2) = (0,0) a 24 horas y 600 mL de CTAB. Como matriz respuesta del diseño, se utilizó los rendimientos (Y) del crudo de AH (CAH) que se obtiene cuando se precipita el producto con etanol. El volumen de etanol adicionado para precipitar el CAH, se mantuvo constante en cada uno de los puntos del diseño, después de estudiar la cantidad óptima de este solvente para precipitar el CAH.

El sedimento de CTAB-mezcla, se separó a velocidades de centrifugación de 2700 gravedades.

El sobrenadante se desechó y el CTAB-mezcla obtenida según las condiciones óptimas del diseño, se resuspendió en 1,2 L de disolución de cloruro de sodio $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ (Danishevsky y Bella, 1966), utilizando de forma similar un agitador mecánico con impelente tipo áncora. El complejo formado CTAB-AH, se fragmentó a esta concentración salina y se obtuvo una suspensión, que se centrifugó a la

misma velocidad del paso anterior durante 20 minutos. En esta etapa, se aprovecha el sobrenadante y se elimina el sedimento.

Se midió el volumen del extracto y se le adicionó un 25% v/v de etanol con el objetivo de eliminar la mayor parte de los AN (Lago y col, 2002; Lago y col, 2005). El sedimento formado se separó por centrifugación a 2700 gravedades durante 20 minutos. Se midió la relación de absorbancia en el extracto sobrenadante (A_{260} / A_{280}) antes y después de adicionado el etanol, con vistas a comprobar la eliminación de los AN. Se completó la adición de etanol al sobrenadante, según la dosis más adecuada, con el objetivo de provocar la precipitación del CAH y al cabo de las dos horas se separó éste mediante centrifugación a 2700 gravedades durante 20 minutos. Para determinar el volumen más adecuado de etanol, se tomó muestras de 10 mL del extracto obtenido a las 48 horas y se adicionaron diferentes volúmenes del mismo, desde 10 hasta 40 mL. Se determinó el rendimiento de CAH en gramos, para cada volumen de etanol añadido.

Después de evaluar las variables óptimas del experimento, se obtuvo 10 lotes de CAH empleando cordón residual y bajo estas mismas condiciones experimentales, 10 lotes de CAH empleando cordones umbilicales humanos. Ambas fuentes de obtención provienen de placentas debidamente evaluadas mediante controles virales adecuados (Inmunoensayos, 1994; CECMED, 1995; Inmunoensayos 1999 a; Inmunoensayos 1999 b). Los CAH obtenidos a partir de ambas fuentes, se compararon entre si según su composición química para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los diferentes indicadores analíticos.

II.3 Caracterización del CAH, obtenido tanto de cordones umbilicales convencionales como cordones residuales. Comparación entre ambos.

Se determinó por evaluación sensorial las características organolépticas como es color, olor, aspecto y solubilidad.

II.3.1 Determinación cualitativa de hexosaminas presente en el CAH.

Se realizó por el método de Elson Morgan (Carney, 1986), para la determinación de la presencia de N-acetilhexosaminas. Se pesó 1 g de muestra y se disolvió en 1 mL de HCl 6 mol.L⁻¹ hidrolizando esta durante 4 horas a 100°C. Se tomó 0,5 mL de la solución anterior mezclándolo con similar cantidad de una mezcla formada por 2 mL de acetilacetona en 48 mL de carbonato de sodio 0,625 mol.L⁻¹ y 1 mL de agua destilada, se calentó a 100°C por 10 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se le añadió 2,5 mL de etanol y se mantiene esta mezcla a 75°C por 5 minutos.

Se añadió a la disolución anterior 0,5 ml de reactivo de Erlich (formado por 1,6 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 30 ml de HCl concentrado) y se calentó a 75°C por 30 minutos. Se enfrió los tubos y añadió 2,5 mL de etanol. La formación de color rojo vino indica de forma cualitativa la presencia de N-acetilhexosaminas en forma de hexosaminas.

II.3.2 Determinación de la concentración proteica.

Se determinó mediante el método de Bradford (1976) debido su alta sensibilidad y rapidez. Se pesaron 0,15 g de CAH y se disolvieron en cantidad suficiente de agua destilada en volumétrico de 50 mL. Los resultados se expresan en por ciento en peso según las cantidades de producto pesadas.

II.3.3 Determinación de azúcares reductores.

La presencia de grupos reductores en estos polisacáridos, se realizó mediante la técnica del 2,4 dinitrofenol (Díaz y Juárez, 1977). El ensayo permitió estudiar la estabilidad del AH contenido en el CAH con el tiempo, debido a que las posibles variaciones en la masa molar de este polisacárido, están asociadas con las variaciones de los azúcares reductores y por tanto con su comportamiento fisicoquímico (Nakamura y Nishida, 1994).

Se utilizó como patrón para la curva de calibración, glucosa cristalina monohidratada pa de la firma Fluka. Se pesó 520 mg de CAH y se disolvió en 50 mL de agua destilada, de esta disolución se tomó cantidad suficiente para realizar el análisis. Los valores finales de la concentración de azúcares reductores se expresan en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y en forma porcentual p/p.

II.3.4 Determinación colorimétrica de ácidos urónicos según el método de Blumerkrantz y Asboe-Hansen (Montreuil y col, 1986).

El método está basado en la reacción de los ácidos urónicos presentes en el CAH con el metahidroxibifenilo. Se pesó 0,3 g de CAH y se disolvió en 50 mL de agua destilada. A 0,2 mL de la solución anterior se le añadió 1,2 mL de una solución $0,0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de tetraborato de sodio en ácido sulfúrico concentrado. Los tubos con las muestras se colocaron en baño de hielo agitando vigorosamente. Posteriormente se colocaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y enfriaron con hielo. Con posterioridad, se le añadió 20 μL de metahidrobifenilo (metahidroxibifenilo al 15% en NaOH al 15% p/v). A los 5 minutos se leyó a 530 nm empleando una curva de calibración utilizando ácido glucurónico como

estándar de referencia, expresándose el contenido de ácidos urónicos en forma porcentual base seca. Esta determinación se realizó en cada una de las etapas del proceso de aislamiento de CAH empleando cordones umbilicales residuales.

II.3.5 Determinación del contenido de ácidos nucleicos en cada una de las etapas del proceso de obtención empleando cordones residuales.

Se realizó la determinación espectrofotométrica de ácidos nucleicos en cada una de las etapas del proceso de obtención de CAH empleando cordones umbilicales residuales, mediante mediciones a 260 nm (Borer, 1975).

II.3.6 Determinación de la humedad residual.

Se empleó la técnica informada para la determinación de la humedad residual, por medio de secado de la muestra a vacío (WHO, 1994). Se tomó 1 g de muestra de CAH y se secó, a vacío en cloruro de calcio, durante 24 horas a temperatura ambiente. Los valores de esta determinación se expresan en por ciento p/p.

II.3.7. Determinación del pH en solución al 1% p/v.

Se disolvió la muestra pesando 1 g en 100 mL de agua desmineralizada y se midió en un pH metro modelo Methrom (NC 90-13, 2000).

II.3.8 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos en 10 lotes de CAH aislados a partir de ambas fuentes, se analizaron desde el punto de vista estadístico, considerando los valores promedios, la desviación estándar y los coeficientes de variación. Éstos se compararon entre sí, para analizar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los indicadores analíticos estudiados.

II.3.9 Estudio de estabilidad del CAH.

Se realizó el estudio de estabilidad de tres lotes consecutivos de CAH almacenados en frascos plásticos de alta densidad desde la hora 0 hasta 28 meses a temperatura desde 2-8°C, mediante el estudio de pH, azúcares reductores, humedad residual, viscosidad al 0,1 % p/v, análisis del contenido de ácidos urónicos y proteínas desde tiempo 0 hasta 28 meses (CECMED, 2000). Los límites establecidos, de los diferentes indicadores como criterio para el estudio de estabilidad, fue la desviación estándar obtenida de las mediciones en 10 lotes consecutivos, con la excepción del pH que por referencias bibliográficas puede moverse en el rango de 7,0 a 9,0 (Karen y Ellington, 1994).

Análisis microbiológico.

Se realizó el conteo de bacterias y de hongos, por medio de la técnica de tubos múltiples (USP XXV, 2002) que tiene como objetivo establecer el método para la determinación de microorganismos viables aeróbicos. Estos resultados sirvieron de base a los estudios de estabilidad.

II.4 Procedimiento para la purificación del AH contenido en el CAH.

La purificación y caracterización de AH a partir de CAH tiene como objetivos:

1. Demostrar la presencia de este polisacárido en el CAH que presenta actividad biológica como cicatrizante.
2. Permite obtener el polisacárido (AH) con un grado de pureza aceptable y comparable con otros de firmas reconocidas.

Se tomó 50 g de CAH y se resuspendió en la mínima cantidad de solución salina de cloruro de sodio 0,2% p/v (1000 mL), el pH de esta solución se ajustó a 4–5

con ácido clorhídrico pa (Readel De Haen) según referencias (Balazs, 1979) y se desproteinizó mediante la adición de diferentes dosis de cloroformo pa (Readel De Haen) entre 2 hasta 20 % v/v para encontrar la cantidad óptima que permita reducir la absorbancia lo máximo posible midiendo las fracciones acuosas a una longitud de onda de 280 nm. En estas extracciones se eliminó la fase clorofórmica y la interfase.

A la solución desproteinizada, se le ajustó el pH a 6-7 empleando NaOH 0,1 mol.L⁻¹, se le adicionó tres volúmenes de etanol y al cabo de dos horas, se centrifugó a velocidades de 5000 gravedades. El AH se resuspendió en 50 mL de agua destilada y se le añadió tres volúmenes de acetona calidad pa (Merck), precipitando el AH en este medio.

El AH purificado, se filtró a través de membrana Sartorius de 0,45 µm y se secó a vacío en una desecadora sobre cloruro de calcio durante 24 horas.

II.5 Caracterización química y físico- química del AH purificado.

II.5.1 Determinación cualitativa y cuantitativa de las unidades monosacáridicas presentes en el AH.

La identificación cualitativa y cuantitativa de las diferentes unidades monosacáridicas presentes en la estructura de un polisacárido, es de vital importancia en la elucidación estructural del mismo. En el caso del AH se emplearon las técnicas de determinación de ácidos urónicos y de N-acetilhexosaminas que son las dos unidades monoméricas que caracterizan a este polisacárido, utilizando el procedimiento de Blumenkrantz y Asboe-Hansen para

la determinación cualitativa y cuantitativa de ácidos urónicos y el procedimiento de Elson-Morgan para la determinación de N-acetilhexosaminas.

II.5.2 Determinación del contenido de ácidos urónicos.

Se realizó por un procedimiento similar al descrito en el epígrafe II.3.4. En el caso del AH purificado se pesó 1 g previamente secado y se disolvió en 100 mL de agua destilada para una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, de esta solución se tomó 0,5 mL que se llevó a un volumétrico de 100 mL y se siguió la técnica descrita. Estas mediciones se realizaron cinco veces y el resultado fue el promedio de estas.

II.5.3 Ensayo cuantitativo de hexosaminas.

Se tomó 3,4 mg de AH purificado y se disolvió en 5 mL de HCl $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ hidrolizando a 100°C durante 6 horas en tubos cerrados. Se tomó 1 mL y se disolvió en 10 mL de agua destilada realizando el ensayo de determinación de N-acetilhexosaminas, aplicando el mismo método reflejado en el epígrafe II.3.1. Determinando la absorbancia a 520 nm después de 30 minutos de haber desarrollado el color y utilizando una curva de calibración con N-acetilglucosamina como referencia.

II.5.4. Determinación de lípidos totales.

Para descartar la presencia de lípidos en el producto purificado, se realizó su determinación, según la técnica descrita por Zollner y Krisch (1962). Se preparó una solución de $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AH purificado en agua y se desarrolló la técnica para comprobar si durante el proceso de purificación quedan residuos de lípidos.

II.5.5 Determinación de la humedad residual.

Se empleó una técnica similar a la utilizada en el epígrafe II.3.6

II.6 Caracterización físico química.

II.6.1 Determinación de la viscosidad cinemática.

La determinación de la viscosidad cinemática, se realizó empleando AH purificado y secado, del cual se pesó 1 g y se disolvió en 100 mL (solución al 1% p/v) de una solución tampón a 25° C que contiene 8,5 mg de NaCl, 0,28 g de Na₂HPO₄·2H₂O y 0,04 mg de NaH₂PO₄·H₂O en 1 L empleando un viscosímetro capilar de la firma Schott-Gerate.

II.6.2 Determinación del contenido de AH mediante el empleo de la cromatografía líquida de intercambio iónico.

Se empleó una columna pre-empacada y monodispersa de alta resolución, de 5 x 50 mm Mono Q HR 5/5 con el empleo de un flujo de 1 mL·min⁻¹ y un gradiente formado por una disolución tampón A de fosfato monobásico de sodio 50 mmol·L⁻¹ a pH 7 y una disolución tampón B formado por A con cantidad suficiente de NaCl para formar una disolución 1mol·L⁻¹.

El gradiente se realizó incrementando la polaridad del medio en solución tampón (B) desde 0 hasta 100% de (B) en 50 minutos y se lee a una longitud de onda de 229 nm.

Se aplicaron 500 µL de AH pa de la firma Fluka y de la muestra experimental a concentraciones de 0,3 µg·µL⁻¹ y 2,8 µg·µL⁻¹ respectivamente. Se realizaron 5 réplicas y los resultados se promediaron y compararon.

II.6.3 Determinación de la masa molar del AH por cromatografía de exclusión molecular.

Según referencias bibliográficas, el AH que se extrae de los tejidos es polidisperso y cubre un rango de masa molar (Balazs y Band, 1984; Devaraj y col, 1992).

Para la determinación de la masa molar del AH purificado experimental, se utilizó un método de filtración por gel empleando condiciones adecuadas en cuanto a la columna, tipo de gel y patrones de polisacáridos de la misma serie homóloga de masa molar conocida dentro del rango de exclusión del gel utilizado.

Para cumplimentar el objetivo anteriormente planteado se empleó una columna de Sepharosa CI-4B de 1,6 cm x 85,0 cm, la cual se equilibró con una solución tampón de fosfato a pH 7 que consiste en 18 g de Na₂HPO₄ · 2H₂O y 12 g de NaCl en un litro a un flujo de 0,8 ml.min⁻¹.

En este caso se utilizó la K_d como constante para caracterizar el rango en que oscila la masa molar del AH en cuestión, éste se calculó a partir de $(V_e - V_o) \cdot (V_t - V_o)^{-1}$ donde V_e es el volumen de elusión, V_o el volumen muerto o volumen de exclusión determinado por una solución de azul de dextrana de masa molar 2×10^6 g.mol⁻¹ a una concentración de 2 mg. mL⁻¹ y V_t es el volumen calculado empleando una solución de dicromato de potasio 2 mg. mL⁻¹.

Se emplearon patrones de polisacáridos de la misma serie homóloga con masa molar desde 4×10^4 hasta 5×10^5 g.mol⁻¹ y se realizó la detección empleando mediciones del índice de refracción, utilizando un refractómetro diferencial de la firma Knauer.

II.6.4 Determinación de la presencia de nucleótidos y proteínas.

La espectroscopia UV se emplea para mostrar los valores de nucleótidos y de proteínas en el AH. Se utilizó con este fin una disolución al 1% p/v de ácido hialurónico en disolución salina $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ (Balazs, 1979). El AH obtenido se almacenó a temperatura de 2 a 8° C , protegido de la luz para su posterior análisis a 280 y 257 nm. De no ser así es necesario una clarificación previa de la misma, que puede realizarse mediante centrifugación a 10000 gravedades durante 20 minutos (Kennedy, 2005). La absorbancia a 257nm mide el nivel de nucleótidos en la disolución y las lecturas a 280 nm es una medida del nivel de proteína. Los valores de absorbancia establecidos, que permiten considerar a este polisacárido con la pureza adecuada para ser utilizado en oftalmología y ortopedia son a 280nm ($\leq 2,00$) y a 257nm ($\leq 3,00$).

II.6.5 Análisis cualitativo y cuantitativo de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina en el AH purificado.

En el análisis estructural de polisacáridos, es necesario determinar la naturaleza de las unidades monosacáridicas presentes (azúcares neutros, ácidos, N-acetilhexosaminas etc.) y especificar cuales de las neutras, ácidas o N-acetilhexosaminas se encuentran presentes en la estructura del polisacárido en estudio. Con el uso de la cromatografía de partición, la determinación de los constituyentes monosacáridicos ha sido una herramienta de notable simplicidad. Para el análisis de monosacáridos, el polisacárido debe ser hidrolizado hasta la formación de unidades monoméricas.

Entre estas técnicas, se conoce la cromatografía de papel o de capa delgada impregnada en celulosa y la cromatografía líquida de alta resolución. Estas permiten, corroborar la presencia de ácido glucurónico y N-acetil glucosamina en el AH purificado.

Análisis mediante cromatografía de papel.

En el presente trabajo se utilizó, la cromatografía de papel ascendente. Se disolvió la muestra (2-5 mg de AH purificado) en 0,25 ml de HCL 4 mol. L⁻¹ y se calentó a 100°C para su hidrólisis por cinco horas en un vial cerrado.

La muestra hidrolizada, se aplicó sobre papel Whatman 3 según la técnica descrita. Ésta, fue comparada con patrones de ácido glucurónico, glucosamina, lactona del ácido glucurónico y ácido galacturónico de la firma Sigma.

Como solvente, se mezclaron 50 mL de n-butanol con 30 mL de piridina y 20 mL de HCL 0,1 mol. L⁻¹. La cámara cromatográfica se dejó saturar durante 24 horas.

Como revelador se aplicó una mezcla formada por disolución de sulfato cúprico en agua y solución amoniacal en forma de aerosol y posteriormente se calentó a 120°C según (Martin, 1986).

II.6.6 Caracterización mediante espectrofotometría de absorción infrarroja y de Resonancia Magnética Nuclear ¹³C y Resonancia Magnética Nuclear bidimensional ¹³C -¹H en el ácido hialurónico.

Análisis mediante técnicas de RMN ¹³C y RMN ¹³C -¹H.

El AH obtenido se disolvió en agua deuterada a concentración de 10 mg.mL⁻¹ y se liofilizó. Este intercambio isotópico y la liofilización se realizaron tres veces. El producto seco se disolvió en agua deuterada y se calentó a temperatura de 57°C.

Éstas fueron las mejores condiciones de concentración y temperatura para obtener el espectro de RMN, debido a la alta viscosidad que alcanza este polisacárido en solución de agua deuterada.

El espectro ^{13}C -NMR se obtuvo empleando un equipo modelo Bruker AC 250 F operado a 62,90 MHz, con un número de caídas de inducción libre de 140000 scans con tiempos de adquisición de 2,5 μs y un ángulo de 45°C . El espectro obtenido, es un espectro desacoplado por fuera de resonancia.

Condiciones experimentales para obtener espectro de Resonancia Magnético Nuclear ^{13}C - ^1H .

Se tomó 6,3 mg de AH purificado y se disolvió en agua deuterada a una concentración de 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta solución se sometió a un tratamiento con ultrasonido por 16 horas para reducir la viscosidad. Esto produce una solución turbia que fue centrifugada para su clarificación a 13000 gravedades. Para obtener el espectro de RMN bidimensional se utilizó un espectrómetro Varian 500 a una temperatura de 70°C . Se emplearon frecuencias de pulso estándar, y una técnica del tipo “Heteronuclear singler quantum coherence” (HSQC) para ^{13}C - ^1H utilizando la frecuencia de Wider y Wuthrich (Wider y Wuthrich, 1993) y el empleo de gradientes de campo pulsado. Las asignaciones espectrales se realizaron, comparando los datos publicados por Cowman y col (1996) y los corrimientos químicos se refirieron a un estándar interno conocido como la [sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil) 3,3,2,2 tetra deuteropropiónico] (d_4TSPA) con $\delta_{\text{H}} = \text{cero}$ y $\delta_{\text{C}} = -1.8$ ppm respectivamente (Wishart y col , 1995).

Los corrimientos químicos de estos espectros se compararon con los informados en la literatura para la N-acetilglucosamina (Saito y col, 1987).

Los desplazamientos químicos de las unidades monosacarídicas de ácido glucurónico en el AH se compararon con los corrimientos químicos del ácido α y β (1 \rightarrow 4) poliglucurónico informados en la literatura (Aono, 1990).

Análisis mediante el empleo de la espectrofotometría de absorción infrarroja

Se empleó la espectrofotometría de absorción Infrarroja, en un equipo modelo FT-IR de la firma Bruker, para la detección de los principales grupos funcionales presentes en el AH purificado y en el AH estándar de referencia. Se tomó 1,0 mg del AH y se mezcló con 300 mg de KBr seco y puro (Readel De Haen), como medio dispersante. El espectro se realizó mediante un barrido desde 4000 a 650 cm^{-1} .

II.7 Caracterización del etanol residual que queda de la obtención del CAH.

El etanol que queda como residuo de la precipitación del CAH se caracterizó, con el objetivo de emplearlo como principio activo en posibles formulaciones de interés farmacéutico y cosmético.

Se le realizaron los siguientes análisis:

- Determinación cualitativa y cuantitativa de la presencia de ácidos urónicos y análisis cualitativo de la N-acetilhexosaminas. Se tomó 200 mL de alcohol residual y se dializó agua a temperatura de 2-8°C durante 48 horas para eliminar el etanol. La solución acuosa resultante, se congeló a -20°C y se liofilizó durante 48 horas. El producto sólido obtenido se disolvió en la mínima cantidad de agua y se utilizó cantidad suficiente para realizar el ensayo de

Blumenkrantz y Asboe-Hansen, para estimar de forma cualitativa la presencia de ácidos urónicos y cantidad suficiente para realizar el ensayo cualitativo de Elson Morgan para la determinación de N-acetilhexosaminas. En este último caso solo se realizó cualitativo debido a que la presencia de proteínas en las cantidades determinadas en este alcohol residual interfiere el análisis.

- Determinación de la composición proteica por el método de Bradford (Bradford, 1976).
- Caracterización organoléptica realizada por apreciación visual y por el color.
- Determinación del porcentaje de etanol, según el procedimiento descrito (USP XXV, 2002).
- Determinación de la composición de azúcares reductores. Se realizó las mediciones en el medio etanólico por la técnica del 2,4 DNF descrita (Díaz y Juárez, 1977) expresadas en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
- Lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda. Se midieron a 280nm para ver posible presencia de proteínas con residuos aromáticos, a 229 nm (Como indicador sugestivo de la presencia de glucosaminoglicanos) y a 254 nm para detectar nucleótidos o ácidos nucleicos.
- Determinación del pH. Se procedió según las técnicas de control establecidas (NC 90-13, 2000), midiendo el valor del mismo por lectura directa.
- Determinación de la masa molar del AH presente en el alcohol residual mediante cromatografía de exclusión molecular. Se empleó una columna de Sephacryl S-100, equilibrada con una disolución tampón de NaH_2PO_4 0,05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 7. Se utilizaron diferentes patrones de polisacáridos de la misma

serie homóloga y de baja masa molar y el azul de dextrana para el cálculo de la K_{av} en función logaritmo de la masa molar ($\log M$). Las determinaciones se realizaron a 206 nm (Orvisky y col, 1992) a un flujo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El presente capítulo tiene como objetivo, mostrar y discutir los resultados de la obtención de un crudo que contiene AH (CAH) a partir de cordones residuales, el cual puede ser empleado, en la formulación de medicamentos con fines cicatrizantes en heridas abiertas y como dermocosmético en afecciones de la piel, además de comparar el mismo con el CAH obtenido de cordones umbilicales humanos mediante el mismo procedimiento. También de purificar y caracterizar el AH, con el propósito de demostrar la presencia de este polisacárido en el CAH y al mismo tiempo obtener un producto, cuyas características físico-químicas le ofrece potencialidades de empleo, como medicamento en oftalmología y en ortopedia en el tratamiento de la osteoartritis de la rodilla y la periartritis del hombro. Se establece una comparación con la literatura conocida y se demuestra las posibilidades que brinda, el empleo de cordón residual que queda como subproducto de otras producciones en el Centro de Histoterapia Placentaria (CHP).

III.1 Caracterización del cordón umbilical residual.

Durante el proceso de obtención del Gel Fotoprotector a partir de placentas umbilicales humanas a término, se extraen un grupo importante de proteínas, lípidos, carbohidratos, sales etc. y queda un cordón umbilical residual que no se le había encontrado un uso adecuado. Según la legislación y normas vigentes,

residuo es todo aquel material derivado de las actividades de producción y consumo, que no han alcanzado en el contexto en que se producen ningún valor económico (Gencat, 1998). Al ser aprovechable para obtener AH deja de ser residuo y se convierte en una fuente novedosa no informada en la literatura. En la tabla IX se presentan los resultados del contenido de grasa, proteína, cenizas y carbohidratos, expresados en g. (100 g)⁻¹, en el cordón residual (CIDEM, 1998). Como se observa, éste presenta una composición de carbohidratos (0,194 g por cada 100 g de cordón residual) y un contenido de proteína mucho mayor que el cordón umbilical humano. Los resultados que se muestran en la tabla IX según informe del CIDEM, son el promedio general del material de partida y no de un lote en particular. Se miden estos indicadores, pues éstas son las magnitudes que caracterizan a los tejidos que componen la placenta humana, en términos de lípidos, glúcidos y proteínas, al ser analizada esta como órgano metabólico y de depósito (Botella y col, 1986).

El bajo contenido de grasas de esta materia prima (Tabla IX) (0,035 g. (100 g)⁻¹), favorece el proceso de extracción propuesto y no es necesario el empleo de ningún método para delipidar estas muestras, como pueden ser el uso de filtros hidrofóbicos (Brun y col, 1990) y los polisacáridos pueden ser extraídos del tejido con el empleo de disoluciones salinas en combinación con la precipitación mediante sales de amonio cuaternaria.

Durante el proceso de aislamiento del Gel Fotoprotector por cada Kg de cordón umbilical procesado, solo queda un 30% (300 g), de estos, 97,8 g corresponden a

Tabla IX. Caracterización del cordón umbilical residual, que queda como subproducto de la elaboración del Gel Fotoprotector.

Indicador analítico	Contenido (g. (100 g)⁻¹)
Humedad	67,31
Sólidos totales	32,60
Grasa	0,035
Proteína	31,80
Ceniza	0,576
Carbohidratos	0,194
Ácido hialurónico	0,130

sólidos totales y 202,2 g de una mezcla formada por agua y el solvente utilizado durante el proceso de extracción del principio activo del Gel Fotoprotector (CIDEM, 1998).

Si se compara el cordón umbilical humano convencional (Tabla V) con el cordón umbilical residual que queda de la elaboración del Gel Fotoprotector (Tabla IX). Existen marcadas diferencias tanto desde el punto de vista cualitativo por su aspecto macroscópico como por su composición química, que hacen del cordón residual, una nueva fuente para la obtención de AH. El cordón umbilical humano molido, es un material gelatinoso y difícil de manipular, posiblemente asociado a la gelatina de Wharton presentes en este tejido, con un elevado contenido de agua (88,90 g. (100 g)⁻¹). Este cordón debe ser almacenado bajo congelación. En cambio el cordón residual es un material seco con muy bajo contenido de agua (7,68 g. (100 g)⁻¹) mucho más fácil de manipular y que se puede almacenar en sacos de nylon a temperatura ambiente, durante períodos de tiempo hasta seis meses. Desde el punto de vista químico, se ha informado que el cordón umbilical humano, contiene un 0,04% p/p de AH que representa 0,40 g por Kg de cordón (Kennedy, 2006) en cambio el cordón residual contiene 1,30 g de AH por Kg de tejido, debido a que durante el proceso de obtención del Gel Fotoprotector no hay pérdidas de este polisacárido, este aspecto se demuestra en este trabajo según los rendimientos experimentales que se obtienen durante la purificación. Esto último hace del cordón residual una fuente mucho más aconsejable para el aislamiento de AH, y no se informó en la literatura revisada este procedimiento.

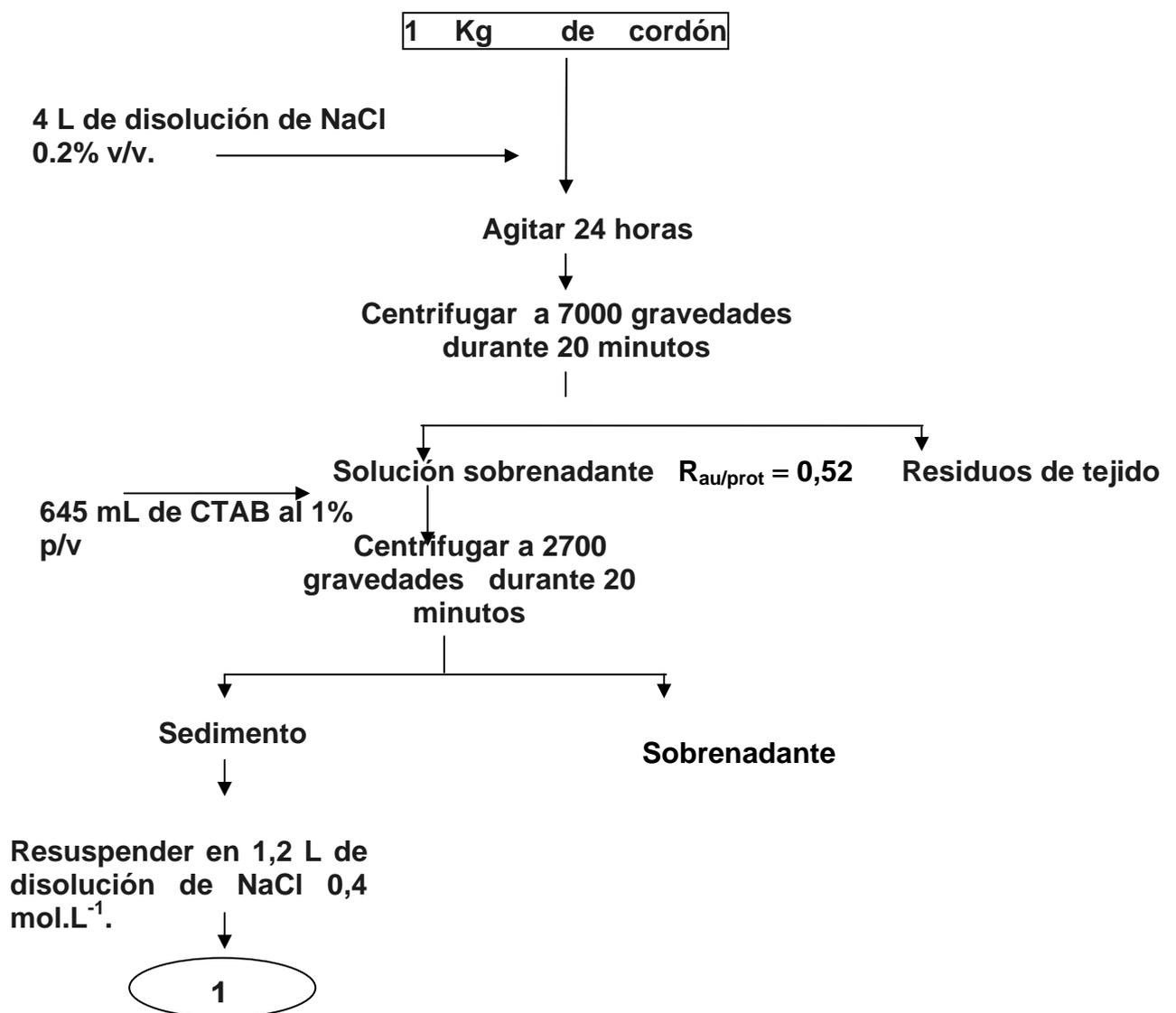
Por otro lado la composición química del cordón umbilical residual es diferente que el cordón umbilical humano convencional, debido a que no se extraen otros principios activos previamente que no interfieren en el rendimiento del AH.

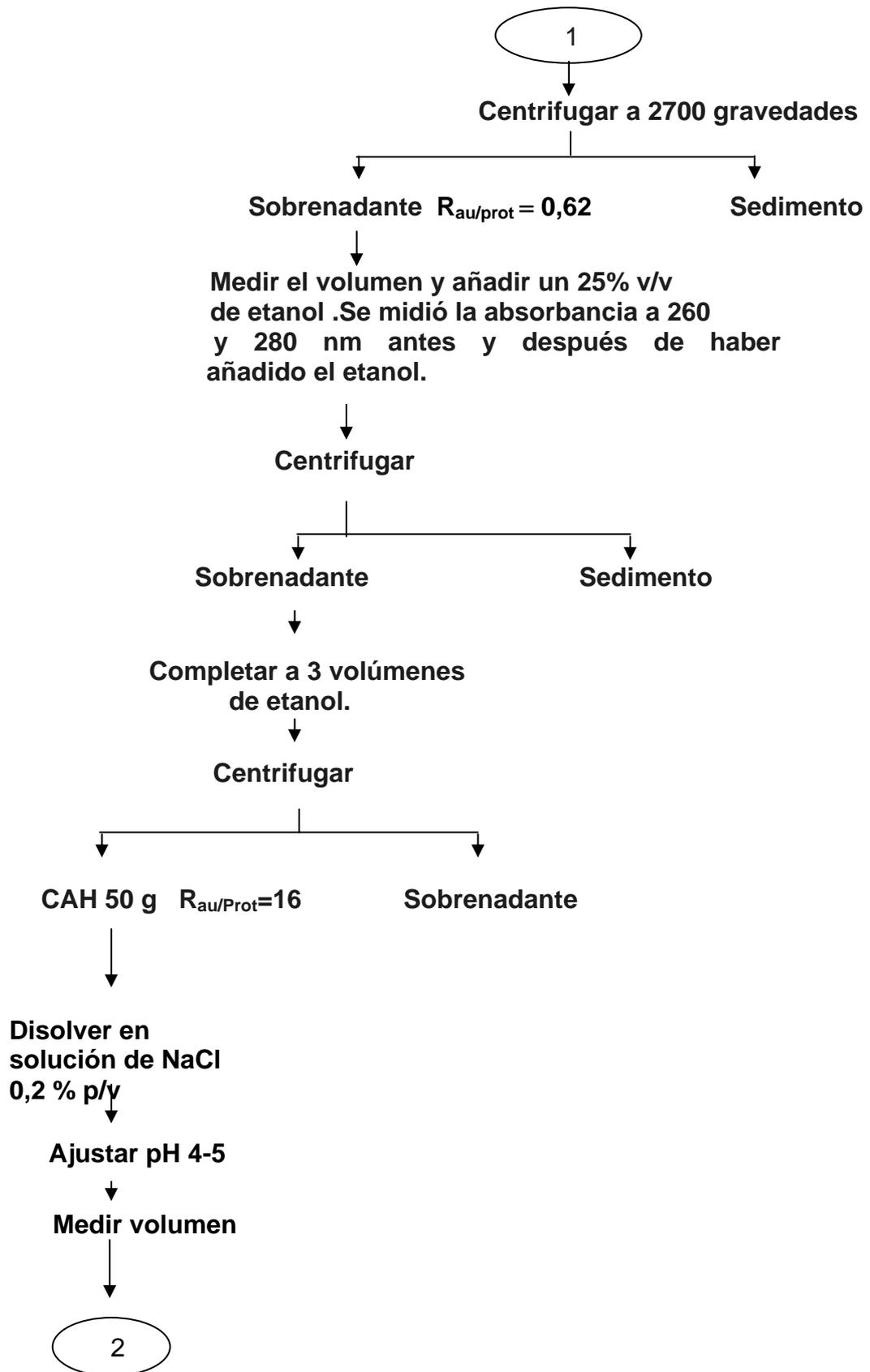
III.2 Aislamiento y caracterización del ácido hialurónico crudo (CAH) obtenido a partir de cordones umbilicales y cordones residuales.

Durante el proceso de extracción, se procesó 1 Kg de cordón residual, al cual se le añadió 4 L de disolución de cloruro de sodio 0,2% p/v mediante el empleo un diseño experimental que se discute a continuación. Se encontró, que a 7000 gravedades se logró una buena separación del extracto salino, respecto al tejido. Esta velocidad de centrifugación es recomendada por otros autores para separar el tejido del extracto (Devaraj y col, 1992)

El CTAB en solución al 1% p/v, permite la formación de complejos insolubles con el AH y otros posibles proteoglicanos (SCh, SH, SQ etc.), además puede precipitar a los AN y algunas proteínas libres. El empleo de esta sal de amonio cuaternaria, no se encuentra informado en la literatura revisada. Para separar este complejo se centrifugó a una velocidad de 2700 gravedades a temperatura de 2-8°C.

En la Fig. 2 se muestra el diagrama de flujo, donde se presenta las diferentes etapas para la obtención de CAH, alcohol residual, AH purificado y los rendimientos obtenidos por cada Kg. de cordón residual. Como se observa del diagrama de flujo, se emplearon 3 volúmenes de etanol por volumen de extracto para precipitar el CAH, estos volúmenes de etanol fue planteado por Danishevsky y Bella (1966), Balazs (1979) y Brun y col (1990) pero empleando en algunos casos cordones umbilicales humanos, crestas de gallo y fluido sinovial. No





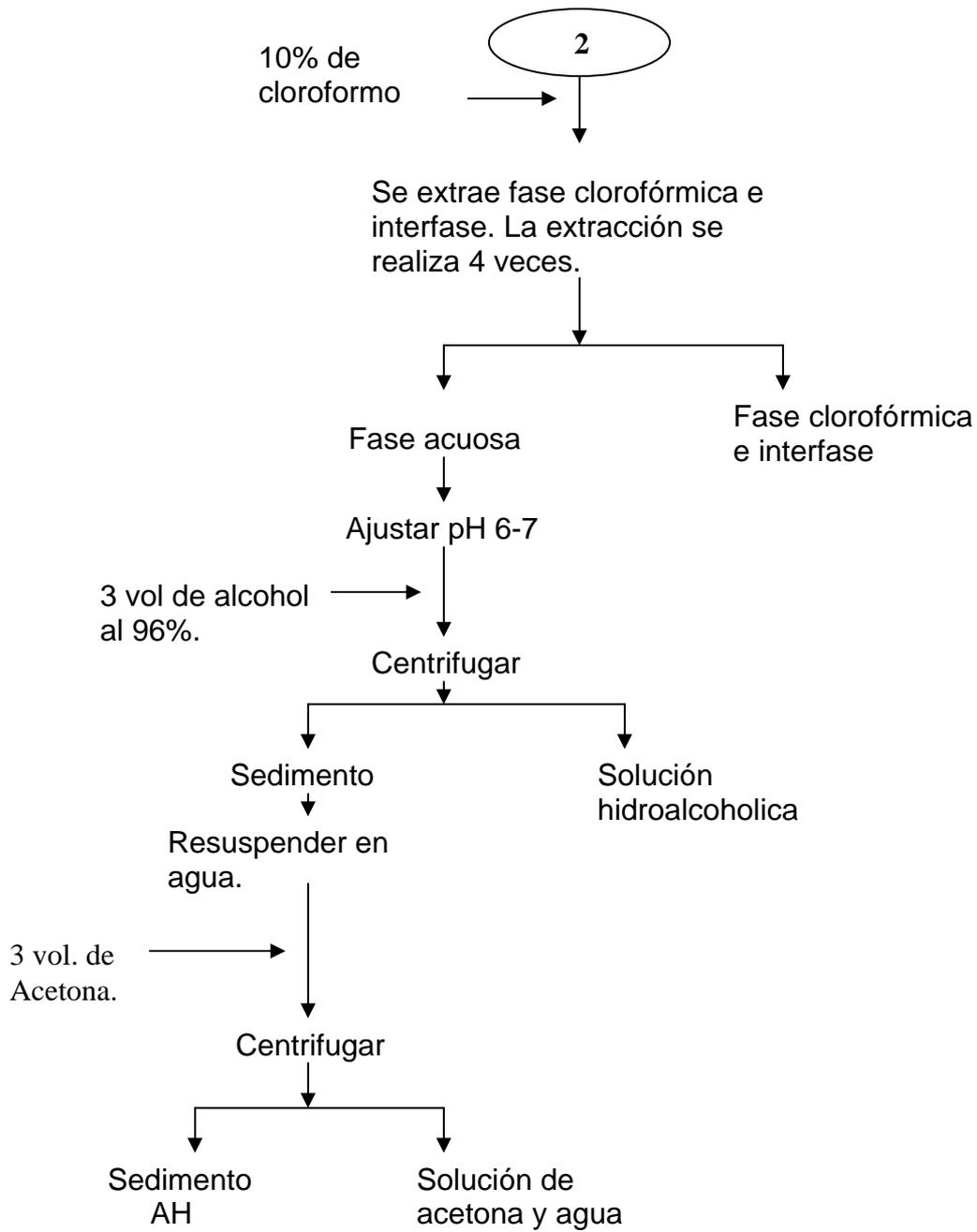


Figura 2. Diagrama de flujo de obtención de AH en forma de CAH y su purificación

obstante, se realizó el experimento en un punto del diseño para comprobar si con tres volúmenes se lograba el mayor rendimiento cuando se utiliza cordones residuales. En la Fig. 3 se observa la cantidad precipitada de CAH, tomando en consideración 10 mL de extracto, en el que se aprecia que con tres volúmenes de etanol se logra el valor máximo en el rendimiento. A partir de este resultado, se realizaron los experimentos, del diseño factorial manteniendo esta relación constante.

De acuerdo al plan experimental realizado a nivel de laboratorio, se logró un modelo que fue el siguiente:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{11} (X_1)^2 + b_{22} (X_2)^2 = 51,11 + 33,3 X_1 + 6,66 X_2 + 5,0 X_1 X_2 - 33,3 (X_1)^2 - 13,33 (X_2)^2.$$

En esta ecuación, X_1 (tiempo de extracción) y X_2 (volumen de CTAB al 1% p/v) son variables codificadas y (Y) es la matriz de los rendimientos del CAH a partir de cordones residuales, obtenido después de precipitado con etanol. En la tabla X aparecen los valores de los coeficientes de la ecuación anterior y el error estándar encontrado en cada uno de ellos.

Los coeficientes de la ecuación anterior, representan el peso estadístico de cada una de las variables. Se encontró que el incremento de los tiempos de extracción influyen de manera positiva en un mayor rendimiento y tienen mayor peso estadístico que la dosis de CTAB al 1% p/v que también influye de forma positiva.

De acuerdo a la ecuación anterior, se logró un valor óptimo para el tiempo de extracción de 16 horas y un volumen óptimo de dosis de CTAB al 1% de 645 mL

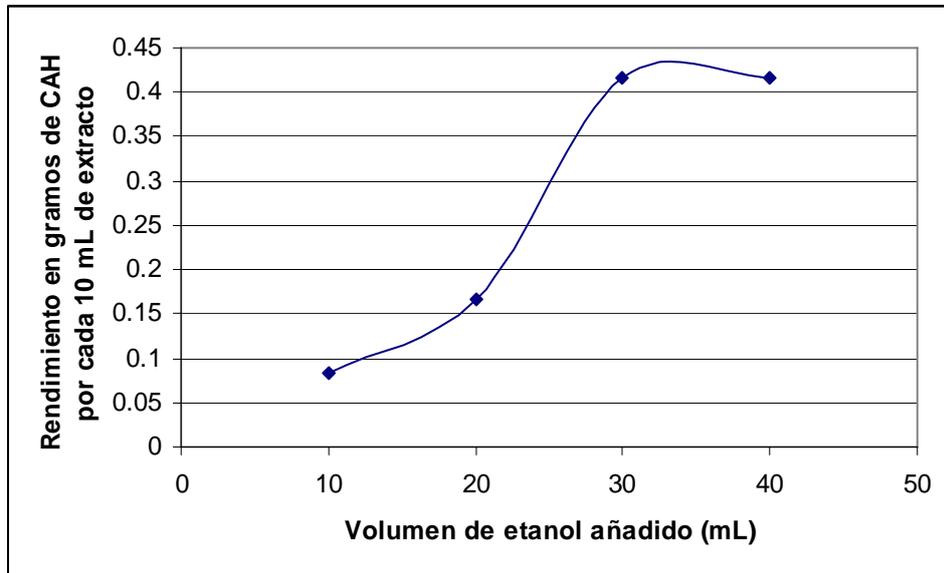


Figura 3 Cantidad de gramos de CAH aislados de 10 mL de extracto, por adición de diferentes volúmenes de etanol. Gráfico obtenido a partir de un punto aleatorio del diseño experimental.

Permite corroborar lo planteado por Danishevsky y Bella en 1966 y Balazs en 1979.

Tabla X Coeficientes y error estándar determinado según el modelo experimental propuesto.

Coeficientes	Valor de los coeficientes	± Error estándar
b_0	51,11	1,89
b_1	33,33	2,07
b_2	6,66	2,07
b_{12}	5,0	2,54
b_{11}	-33,33	3,60
b_{22}	-13,33	3,60

Para obtener los coeficientes expresados en la tabla, se realizaron tres réplicas en el punto central de un diseño factorial 3^2 . Se consideró las variables tiempo de extracción y volumen de CTAB añadido, debido a que las mismas no han sido descritas en la literatura, para esta fuente de obtención. No así, el volumen de etanol para precipitar el polisacárido ni la concentración de CTAB.

después de calcular los valores máximos encontrados en la ecuación cuadrática obtenida del diseño experimental.

Este procedimiento se aplicó bajo las mismas condiciones experimentales empleando cordones humanos convencionales. Para 1,2 L de extracto salino se logró 50 g de CAH independientemente de la fuente de obtención.

Además la relación de A_{260} / A_{280} del extracto, varía desde valores de 1,0 antes de adicionar el etanol hasta 0,62 cuando se añadió un 25% inicial de etanol, al emplear cordones residuales. En el caso de los cordones humanos convencionales, la relación varió desde 2,5 hasta 0,8 debido a que en el cordón umbilical humano, las proteínas y los ácidos nucleicos difunden con más facilidad del tejido hacia la solución salina, bajo estas condiciones de extracción.

En la tabla XI aparecen los resultados analíticos promedios, la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) de los diferentes indicadores analíticos, del crudo de AH (CAH) aislado a partir de cordones umbilicales residuales y en la tabla XII, de cordones umbilicales humanos convencionales al aplicar las condiciones óptimas del diseño, encontradas para cordón residual a 10 lotes de CAH. En los mismos se presentan las mediciones de la humedad residual (% p/p), contenido de ácidos urónicos en por ciento (bs) (base seca), azúcares reductores (%), porcentaje de proteínas, pH, % ácidos urónicos (bs) / % proteínas y un resto (R) en donde se encuentra el AH y otras posibles sustancias y se logró un rendimiento promedio de 50 g de AH en forma de crudo (CAH), independiente de la fuente de obtención. El CAH obtenido de cordón residual, presentó una humedad promedio de 88% p/p y a partir de cordón umbilical convencional 85%

Tabla XI. Caracterización química del CAH, obtenido a partir de cordón umbilical residual.

Réplicas	Humedad residual %	Au (bs)%	Azúcares reductores %	Proteínas %	R %	R _{au/prot}	pH
1	88,0	45,0	1,4	2,7	9,3	16,66	8,3
2	88,0	44,0	1,5	2,8	9,2	15,71	8,4
3	88,0	45,0	1,4	2,8	9,2	16,70	8,4
4	88,0	45,0	1,3	2,8	9,2	16,70	8,4
5	89,0	45,0	1,5	2,8	8,2	16,07	8,4
6	89,0	45,0	1,3	2,7	8,3	16,66	8,3
7	89,0	45,0	1,4	2,7	8,3	16,66	8,4
8	89,0	45,0	1,3	2,7	8,3	16,66	8,3
9	88,0	44,0	1,3	2,8	9,2	15,71	8,4
10	88,0	45,0	1,3	2,8	9,2	16,07	8,2
X	88,4	45,0	1,4	2,8	8,8	16,07	8,4
DS	0,52	0,42	0,082	0,052	0,49	0,49	0,07
CV	0,58	0,94	5,88	1,87	5,55	3,05	0,83

Donde X son los valores promedio, DS la desviación estándar y CV el coeficiente de variación.

Tabla XII Caracterización química del CAH, obtenido a partir de cordón umbilical humano convencional

Réplicas	Humedad residual. %	Au (bs) %	Azúcares reductores %	Proteínas %	R %	R _{au / prot}	pH
1	85,0	35,0	1,0	8,0	7,0	4,38	8,0
2	85,0	35,0	1,0	8,0	7,0	4,38	8,0
3	85,0	36,0	1,0	7,6	7,4	4,74	8,4
4	85,0	35,0	1,0	7,6	7,4	4,60	8,0
5	84,0	35,0	1,0	8,1	7,9	4,32	8,4
6	85,0	36,0	1,0	8,2	6,8	4,39	8,0
7	85,0	35,0	1,0	8,0	7,0	4,38	8,0
8	85,0	35,0	0,9	7,6	7,4	4,60	7,9
9	85,0	35,0	1,0	7,5	7,5	4,67	8,0
10	85,0	35,0	1,0	7,6	7,4	4,61	8,2
X	85,0	35,0	1,0	7,8	7,2	4,51	8,1
DS	0,32	0,42	0,013	0,26	0,33	0,33	0,18
CV	0,37	1,19	3,19	3,4	4,5	7,31	2,21

Donde: %R es el porcentaje de AH y otros GAGs que pueden estar presentes como contaminantes, X valores promedios, DS desviación estándar y CV coeficiente de variación.

(Tabla XI y XII) además, hay presencia de cierta cantidad de proteínas que pueden encontrarse de forma libre o asociadas en forma de proteoglicanos como SCh, SQ, SH etc que forman asociaciones covalentes con las mismas. En la bibliografía consultada se establece que a concentraciones de cloruro de sodio $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ se rompe principalmente el complejo formado entre el AH y el CTAB, no obstante pudieran disociarse también los complejos formados con otros proteoglicanos (Danishevsky y Bella, 1966).

De acuerdo a la (Tabla XI) se encontró un contenido de ácidos urónicos en base seca de un 45% p/p, un residual R en donde debe aparecer el AH con otros posibles contaminantes de un 8,8% (4,4 g) y 2,8% (1,4 g) de proteínas. Este último aspecto se considera de interés por cuanto en las primeras etapas del proceso de extracción, se logró reducir la concentración de proteínas en el CAH, variando solamente la fuente de obtención y de forma experimental se ha encontrado que en el cordón residual las proteínas no difunden del tejido hacia la solución salina al 0,2% p/v con la misma facilidad que ocurre en el cordón humano. Este aspecto no se encuentra informado por otros autores, cuando se utilizan otras fuentes de obtención conocidas (Brund, 2000; Shibata, 2000) lo que le confiere valor a la combinación del método empleado y la fuente de obtención, ya que el procedimiento propuesto para aislar el CAH se realiza solo en tres días. En los resultados de la tabla XI se muestra que los coeficientes de variación son menores que 10 para todos los indicadores.

Se midió el contenido de AN, en cada una de las etapas del proceso de obtención del CAH aislado de cordones residuales, que permitió demostrar que mediante el

procedimiento utilizado, se logró reducir los AN, a valores mucho más bajos. En la Fig.4 aparecen estos resultados en los cuales como se observa hay una reducción hasta valores por debajo de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en la etapa final en donde se le adicionó un 25% de etanol.

En la tabla XII se muestran los resultados analíticos de diferentes lotes obtenidos de CAH al emplear cordones umbilicales humanos convencionales como material de partida. Los rendimientos son similares a los obtenidos empleando cordones umbilicales residuales (50 g), pero este crudo presenta un contenido de proteína superior (7,8% p/p) equivalente a 3,9 g, un contenido de ácidos urónicos inferior (35% p/p) y un residual R, en el que se encuentra presente el AH y otras posibles sustancias contaminantes 7,2% p/p (3,60 g).

Al comparar los indicadores anteriores, se hace evidente de que el empleo de cordones umbilicales residuales permite obtener un producto con mayor pureza respecto al contenido de AH.

Se realizó una comparación entre los valores promedios de los diferentes indicadores que caracterizan al CAH obtenido de ambas fuentes, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas. Se tuvo en cuenta el análisis de los valores promedios, la diferencia entre las medias, el intervalo de confianza asumiendo iguales varianzas y el nivel de significación para un 95% de confianza. Para el caso de los azúcares reductores, existen diferencias significativas entre las medias (el intervalo asumiendo iguales varianzas para un 95% de confianza incluye el valor cero), de hecho debe esperarse un valor más elevado en los reductores, cuando se emplea los cordones residuales como materia prima para la

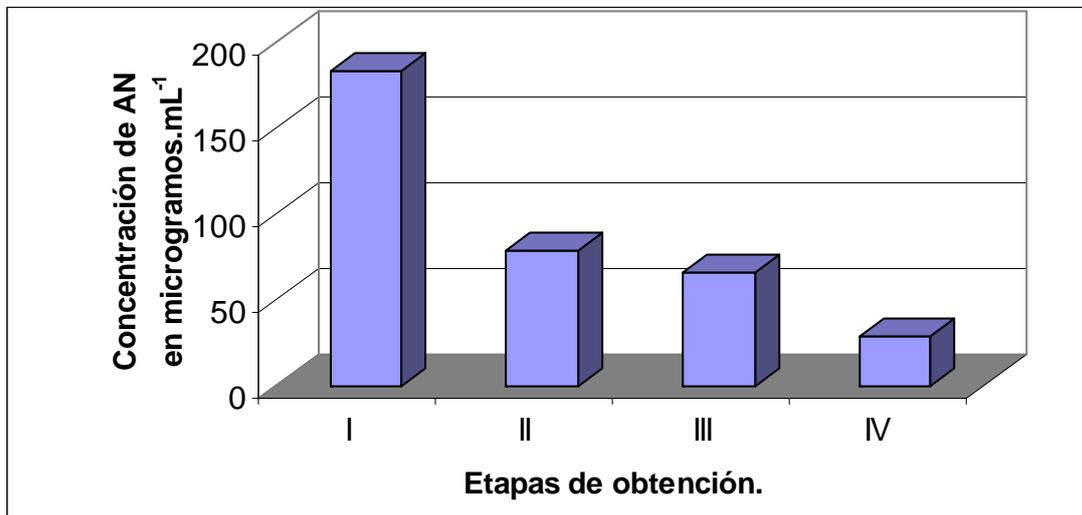


Figura 4 Variaciones de la concentración de ácidos nucleicos en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en diferentes etapas del proceso de obtención de CAH a partir de cordones residuales.

- I. Extracto salino al 0,2% p/v.
- II. Sobrenadante que queda después de la formación del complejo CTAB-AH.
- III. Suspensión resultante que queda después de romper el complejo CTAB-AH con solución de cloruro de sodio $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$.
- IV. Solución resultante después de la adición de un 25% de etanol y posterior centrifugación.

elaboración del CAH, debido a la continua manipulación previa del tejido. En discusiones posteriores se demuestra que el AH contenido en el CAH obtenido de cordones residuales, aún con estos niveles de reductores, presenta valores de masa molar y viscosidad cinemática adecuada según las exigencias de productos viscoelásticos y cicatrizantes (Balazs, 1979; Colin y col, 1995).

En el caso del contenido de proteínas, también se encontraron diferencias significativas en el contenido de éstas, siendo inferior en el producto obtenido a partir de cordones residuales, debido a las características intrínsecas de esta fuente y su composición química (Melgares, 1998).

En la tabla XIII se muestran los resultados estadísticos comparativos entre los cordones umbilicales humanos convencionales y los residuales en cuanto a los indicadores pH, %Au_{bs}, % proteína, % de azúcares reductores, %R y Rel au/prot. que permiten establecer si existen o no diferencias significativas entre sus medias y por tanto considerar los beneficios del empleo del cordón residual como una nueva fuente no informada en la literatura. Como se observa solo el indicador pH no mostró diferencias entre las medias, fue el único indicador en que el intervalo para un 95 % de confianza asumiendo iguales varianzas incluyó el valor cero.

Un aspecto de interés dentro de los análisis para la caracterización del AH presente en el CAH aislado tanto de cordón umbilical humano convencional como de cordón residual, fue el análisis cualitativo de la presencia de N-acetilhexosamina mediante el empleo de la técnica de Elson Morgan. El ensayo permitió detectar la presencia de N-acetilhexosaminas en forma de hexosaminas

Tabla XIII Resultados estadísticos comparativos entre los diferentes indicadores analíticos del CAH obtenido de cordones humanos y cordones residuales.

	pH	Au (bs)%	Prot. %	R %	R _{au/prot}	Azucares Reductores %
C. hum.	8,1	35	7,8	7,2	4,51	1,0
C. res.	8,4	45	2,8	8,8	16,07	1,4
Intervalo para un 95% de confianza asumiendo iguales varianzas	-0,2568 a 0,10747	-1,0336 a -9,6330	-5,2115 a -4,4418	-1,9499 a -1,1700	-2,1642 a -1,5418	-0,4501 a -0,3365

Donde C.hum. Es el producto obtenido a partir de cordones umbilicales humanos y C.res. El producto obtenido a partir de cordones residuales.

libres después de la hidrólisis ácida del CAH. No obstante ser un indicador de la presencia de N-acetilhexosaminas no es específico para la N-acetilglucosamina.

III.3 Análisis de la relación ácidos urónicos / proteínas ($R_{\text{au/prot.}}$) en las etapas principales de la extracción empleando cordones residuales como materia prima.

Como se puede observar de las tablas XI y XII al establecer una relación entre el contenido de ácidos urónicos con respecto al contenido de proteína existen diferencias apreciables que permiten diferenciar ambas fuentes de obtención, esta relación es cuatro veces superior cuando se emplean cordones residuales.

La determinación de la relación ácidos urónicos / proteínas ($R_{\text{au/prot.}}$), en la primera etapa de extracción con solución salina 0,2% p/v dio un valor de $R_{\text{au/prot}} = 0,52$. Este primer extracto presenta un contenido de proteína 0,33% p/v superior al nivel de ácidos urónicos (0,17% p/v) indicador de la presencia de GAGs. En la segunda etapa posterior a la precipitación con sal de amonio cuaternaria y subsiguiente disociación de estos complejos CTAB-AH por adición de solución salina 0,4 mol.L⁻¹ la relación se eleva a valores de $R_{\text{au/prot}} = 0,62$ y aunque la concentración proteica aún es superior ($R_{\text{au/prot}} < 1$) disminuye a un 0,28 % p/v respecto a la primera extracción incrementándose la pureza en AH. El producto final precipitado con etanol presenta muy bajo contenido proteico y la relación $R_{\text{au/prot}} = 16$.

III.4 Purificación y caracterización del AH.

Se conoce que en el cordón umbilical humano convencional existe un 0,04% p/p de AH (Weissman y Meyer, 1954; Raioa y col, 2004; Raiova y col, 2005; Kennedy, 2006) que equivale a 0,40 g.Kg⁻¹ de cordón umbilical convencional. Considerando

que durante el proceso de elaboración del Gel Fotoprotector solo queda un 30% de residuos, basado en una pérdida de proteínas ya sea libres o en forma de proteoglicanos, lípidos, carbohidratos y agua, la cantidad teórica disponible de AH para extraer del cordón residual es de $1,3 \text{ g.Kg}^{-1}$ del mismo.

En la Fig. 5, se observa el comportamiento de la absorbancia de la fracción acuosa medida a 280 nm, como índice del contenido de proteínas en diferentes extracciones clorofórmicas, con dosis de 2 hasta un 20% v/v. Se puede analizar que con un 10 % de cloroformo se logran resultados satisfactorios con tres extracciones. En los casos de 2 y 5 % son necesarias más extracciones para llegar a los resultados que se logran con 10 %. Como se observa de la Fig. 5 la dosis del 20 % es similar al 10% y estas dos curvas pueden ser superpuestas. Este aspecto, es una de las inconsistencias del procedimiento informado por Balazs (1979), al emplear volúmenes de cloroformo similares a los volúmenes de extracto y los trabajos de Brun y col (1990) con el empleo de mezclas de fenol / acetato de sodio bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos con 10% de cloroformo, indican hasta un 84% de reducción de las proteínas en la última etapa de extracción. Estas últimas se reducen aún más al precipitar con alcohol y luego con acetona. La evidencia de estos resultados viene dada después de la caracterización del polisacárido purificado. Lo anterior es de esperar, por cuanto se trabajó con un crudo de AH (CAH) con bajo contenido de proteína (2,8%), al ser aislado de un material biológico previamente tratado.

Se obtuvo de 4,0 g de AH purificado base húmeda con un 65% de humedad residual a partir de 50 g de CAH, con una pureza relativa del 99,38 % sobre la

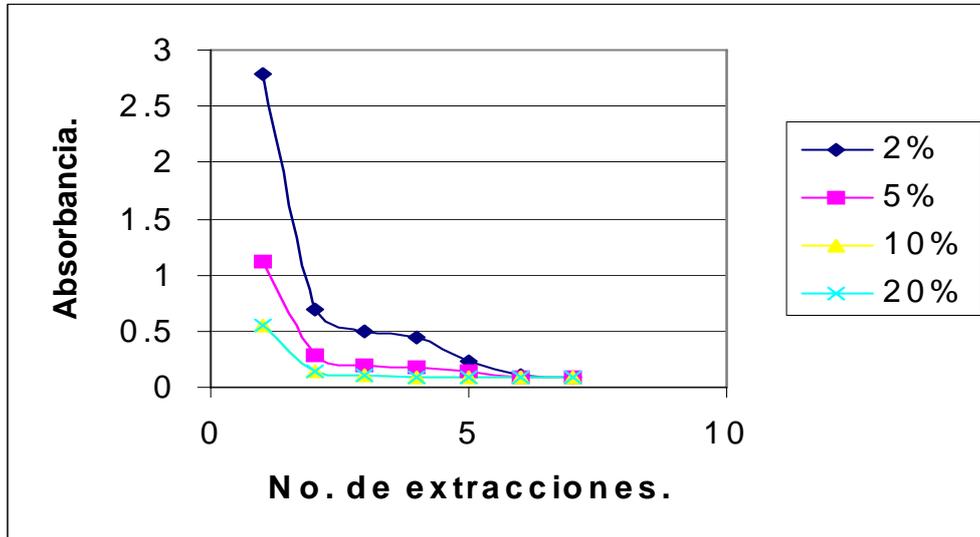


Figura 5 Absorbancia medida a 280 nm de la fracción acuosa, en diferentes extracciones con diferentes volúmenes porcentuales de cloroformo. Como se observa con un 10% v/v se logró resultados similares que con un 20% v/v. En ambos casos la reducción de las lecturas de absorbancia a 280 nm como indicador de la presencia de proteínas son más rápidas y efectivas que a 2 y 5% v/v.

base de las mediciones mediante cromatografía de intercambio iónico las cuales se corroboraron más tarde con el empleo de técnicas RMN ^{13}C - ^1H y RMN ^{13}C . Lo anterior significa que se puede obtener como promedio, alrededor de 1,2 g de AH purificado (bs) por Kg. de cordón residual (0,12% p/p). La cantidad obtenida de 4 g, representa un 0,4% p/p de rendimiento base húmeda tomando en cuenta que se parte de 1 Kg de cordón residual y un 93 % base seca considerando la cantidad teórica de AH (1,3 g) en el cordón residual. En otros trabajos se ha informado rendimientos más bajos (0,08%-0,09%) sobre la base de emplear fuentes biológicas vírgenes, en las cuales pueden existir otros posibles contaminantes que reduzcan el rendimiento, como es el caso del cordón umbilical humano convencional y las crestas de gallo (Danishevsky y Bella, 1966; Balazs, 1979). El empleo de tales fuentes, trae como consecuencia la necesidad de un mayor número de pasos para su extracción y posterior purificación. Este aspecto le confiere valor al método propuesto, ya que se obtienen rendimientos superiores en un menor número de etapas, en comparación con otros procedimientos informados en la literatura y teniendo en cuenta que en este caso se emplea, una materia prima de desecho como es el cordón residual.

En la tabla XIV se presentan los resultados comparativos entre el AH obtenido mediante procedimiento propuesto a partir de cordones residuales y lo informado en la literatura utilizando las crestas de gallo como fuente de obtención. En esta tabla XIV, se puede apreciar similitud en el resto de los indicadores analíticos, que caracterizan al AH obtenido según la metodología propuesta y que pueden ser comparables con el AH obtenido mediante el procedimiento de Balazs (1979).

Tabla XIV. Resultados comparativos entre el AH obtenido por el método propuesto y el descrito por Balazs (1979)

Indicadores	AH experimental	AH informado por Balazs (1979)
Absorbancia de una solución al 1% p/v	257 nm 0,120 280 nm 0,093	257 nm 0,243 280nm 0,198
Rendimiento (bs)	0,12 % p/p	0,07 % p/p
Masa molar (g.MoL ⁻¹)	5,0 x10 ⁵ – 2,0 x 10 ⁶	7,5 x10 ⁵ – 1,6 x 10 ⁶

III.5 Análisis químico del AH purificado.

III.5.1 Caracterización organoléptica.

El AH purificado a partir de cordón umbilical residual resultó ser desde el punto de vista organoléptico: Incoloro, inodoro, forma soluciones viscosas al 1% p/v en solución tampón fisiológico. Es insoluble en etanol y acetona pero por sus características estructurales puede retener considerable cantidad de agua cuando se precipita sobre todo con etanol.

III.5.2 Determinación cuantitativa de hexosaminas.

Las mediciones del contenido de hexosaminas, realizadas por quintuplicado, a partir de una disolución preparada, de AH a concentración de $6,8 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$, según lo descrito en el capítulo de materiales y métodos, se obtuvo como resultado una concentración de las mismas de $3,5 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$, que representa un 51% p/p respecto a la muestra de AH experimental empleada. Ésta se comparó con el AH de referencia (Tabla XV).

III.5.3 Determinación de ácidos urónicos.

El ensayo se realizó por quintuplicado según lo planteado en el capítulo de materiales y métodos, a partir de una disolución de AH de concentración conocida. El valor medio obtenido de ácidos urónicos ($2,50 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$) representa un 50% p/p respecto a la muestra de AH original. En el caso del AH de referencia se logró valores de ácidos urónicos ($2,32 \times 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$) con un valor porcentual de un 46% p/p.

Los valores obtenidos del contenido de ácidos urónicos y N-acetilhexosaminas resultan lógicos, al estar constituida la molécula de AH de una unidad dimérica

Tabla XV. Comparación de algunos análisis químicos entre el AH experimental y el AH de referencia.

Indicadores	Ácido hialurónico (muestra experimental)	Ácido hialurónico (referencia)*
Masa molar g.mol ⁻¹	$2 \times 10^6 \geq M \geq 5 \times 10^5$ g.mol ⁻¹ ($K_d \leq 0,24$).	7×10^6 g.mol ⁻¹
Viscosidad cinemática** (cst)	11693 cst ($0,011693 \text{ M}^2 \text{ S}^{-1}$)	16636 cst ($0,016636 \text{ M}^2 \text{ S}^{-1}$)
UV análisis 257 nm 280 nm	0,120 0,093	0,118 2,0
ácidos urónicos (mg.mL ⁻¹) ***	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,32 \times 10^{-2}$
N-acetil hexosaminas (mg.mL ⁻¹) ***	$3,50 \times 10^{-2}$	$3,20 \times 10^{-2}$

* AH de referencia suministrado por la firma Fluka (Catalogo Fluka,2003). ** La viscosidad cinemática se puede expresar también en metros cuadrados por segundo.*** A partir de soluciones de AH de concentraciones de 5×10^{-2} mg.mL⁻¹ para la determinación de ácidos urónicos y $6,8 \times 10^{-2}$ mg.mL⁻¹ para la determinación de N-acetilhexosaminas.

repetitiva de ácido glucurónico y de N-acetilglucosamina. Las cantidades encontradas guardan relación con la pureza del AH obtenido. Además son comparables con el AH empleado como referencia. No obstante se requiere de técnicas más complejas y de mayor especificidad que demuestren la presencia de estos monómeros en el AH purificado.

III.5.4 Determinación de lípidos totales

El análisis de lípidos totales, se realizó por triplicado y mostró un valor medio de 0,009 mg.mL⁻¹. Este valor se encuentra dentro del error del método calculado de \pm 0,01488 mg.mL⁻¹ por lo que se puede considerar y demostrar, que mediante el proceso de aislamiento a partir de cordones residuales y purificación mediante extracciones con cloroformo se logró un producto libre de lípidos.

III.6 Caracterización químico-física del AH purificado.

III.6.1 Determinación del contenido de nucleótidos y proteínas.

Se empleó la relación de absorbancia 257 / 280 nm como índice del contenido de nucleótidos y proteínas, respectivamente. Después de realizar cinco mediciones, a partir de una solución de AH purificado preparada al 1% p/v en solución fisiológica, los valores de absorbancia a 257 nm fueron como promedio 0,120 y a 280 nm de 0,093. Estos valores de absorbancia se encuentran dentro de los establecidos en la literatura como aceptables para el AH purificado para su empleo como viscoelástico en oftalmología (Miles, 1986; Barry, 1990). En la tabla XIV se presentan valores más bajos en estas lecturas de absorbancia para la muestra experimental, que lo informado en la literatura (Balazs, 1983). Por lo

tanto, este indicador es una medida de las ventajas del procedimiento empleado y de la fuente de obtención utilizada con respecto a otras conocidas.

III.6.2 Viscosidad cinemática.

Se realizaron cinco mediciones de la viscosidad cinemática, a una disolución de AH de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en una disolución tampón de fosfato al 1% p/v y se comparó con AH utilizado como estándar de referencia. Los valores de la viscosidad cinemática fueron mayores que 10000 cst en este caso 11693 cst ($0,011693 \text{ M}^2 \text{ S}^{-1}$) para la muestra experimental y 16636 cst ($0,016636 \text{ M}^2 \text{ S}^{-1}$) para el estándar de referencia de AH. Estos valores de viscosidad cinemática para el AH experimental se encuentran dentro de los admisibles en la literatura para ser considerado un producto de utilidad en oftalmología y en ortopedia ($\geq 10000 \text{ cst}$) (Pape, 1980; Polack y col, 1981; Stegmann y Miller, 1981; Polack, 1982; Lym y col, 2004). En la tabla XV aparecen los resultados de las mediciones de la viscosidad cinemática en comparación con el material de referencia. En la literatura algunos autores (Nakamura y Nishida, 1994) plantean que existe una relación entre la viscosidad y la masa molar según la expresión $(\eta) = 2,36 \times 10^4 \times (M)^{0,78}$ y a pesar de la similitud relativa de las masas molares promedios entre el AH experimental y el de referencia, es posible que el porcentaje de abundancia relativa de masas molares altas en el AH de referencia sea superior que en el AH experimental y por consecuencia exista una diferencia en las viscosidades entre ambas muestras, no obstante ser considerados aceptables para su empleo como viscoelástico en solución fisiológica al 1% p/v. Según la expresión de Nakamura y Nishida (1994) la viscosidad muestra una tendencia exponencial con las variaciones de la masa

molar.

III.6.3 Determinación de la masa molar del AH purificado.

El método empleado para la determinación de la masa molar promedio en peso, está basado en el empleo de la cromatografía de filtración por gel bajo condiciones de flujo adecuadas y utilizando patrones de polisacáridos de una misma serie homóloga (ver materiales y métodos).

En la Fig. 6 se muestra los resultados de la medición de la K_d en función del logaritmo de la masa molar ($\log M$). De la Fig. 6 se dedujo una ecuación lineal

$$K_d = -0,2387 \log M + 1,8141 \text{ con un } R^2 = 0,9961.$$

La muestra de AH purificada, previamente liofilizada se reconstituyó con el mismo tampón de fosfato-solución salina a pH 7 utilizado en la columna de Sepharosa Cl-4B. Los resultados se muestran en la Fig. 7, encontrándose un máximo de absorbancia a 82 minutos $K_d = 0,08$ (punto 1), sin embargo se puede establecer que el 80% de la fracción tiene un $K_d \leq 0,24$ (punto 2) y un rango en la masa molar promedio en peso de $2 \times 10^6 \geq M \geq 5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ comparable con AH de referencia, con valores de $7,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ y con lo informado por otros autores (Balazs, 1979; Beaty y col, 1985; Orvisky y col, 1992).

En la tabla XV se puede ver en forma resumida los resultados de los ensayos químicos del AH experimental comparados con algunos de estos realizados en el AH de referencia. Se puede observar en esta tabla valores similares en cuanto a viscosidad cinemática, contenido de ácidos urónicos, N-acetilhexosaminas y lecturas de absorbancia a 280 nm para la muestra experimental de (0,093) inferior al valor determinado en el AH utilizado como referencia (2,0).

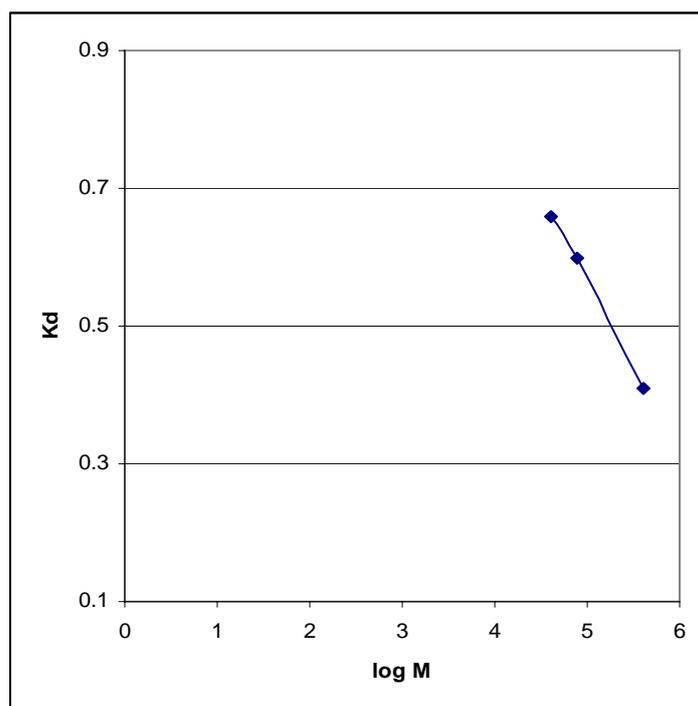


Figura 6 K_d en función de los log de la masa molar (M), obtenida de patrones de polisacáridos de la misma serie homologa. Se logró un modelo lineal $K_d = -0,2387 \log M + 1,8141$ con un $R^2 = 0,9961$, que permitió calcular la K_d del AH obtenido experimentalmente.

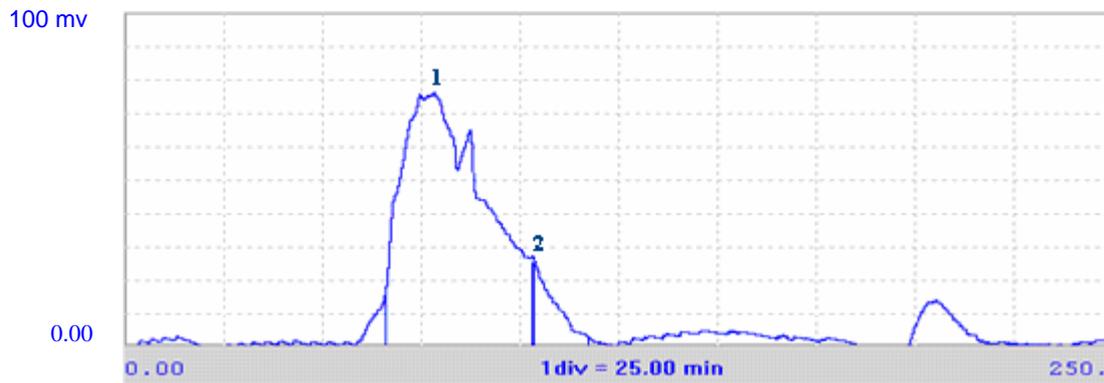


Figura 7. Cromatograma obtenido del AH experimental mediante detección refractométrica para determinar la K_d . Se empleó una columna de Sepharosa Cl-4B 1,6 cm x 85,0 cm, equilibrada solución tampón de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en NaCl a pH 7 y un flujo de $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y un detector de la firma Knauer. Se observa un máximo de absorbancia a 82 minutos $K_d = 0,08$ (punto 1), sin embargo se puede establecer que el 80% de la fracción tiene un $K_d \leq 0,24$ (punto 2) y un rango en la masa molar promedio en peso de $2 \times 10^6 \geq M \geq 5 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

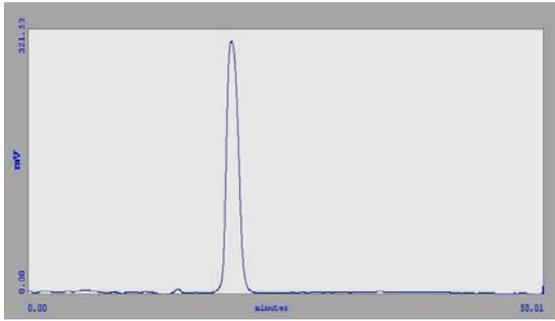
III.6.4 Análisis por cromatografía de intercambio iónico.

En los cromatogramas obtenidos utilizando una muestra experimental Fig. 8 (a) y la de referencia 8 (b), se pueden observar una fracción minoritaria, asociada con proteínas que eluyen con un tiempo de retención medio de 14 minutos. En la tabla XV se presentan valores de absorbancia a 280 nm de 0,093 para el AH experimental que indica la presencia de proteínas, que no es detectable por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se observó además una fracción mayoritaria que caracteriza la sal sódica del AH y que eluye posteriormente con tiempo de retención medio de 20 minutos, esto se debe a la mayor interacción con el intercambiador aniónico por la presencia de los grupos carboxilos del ácido urónico constituyente de la unidad repetitiva de este polisacárido.

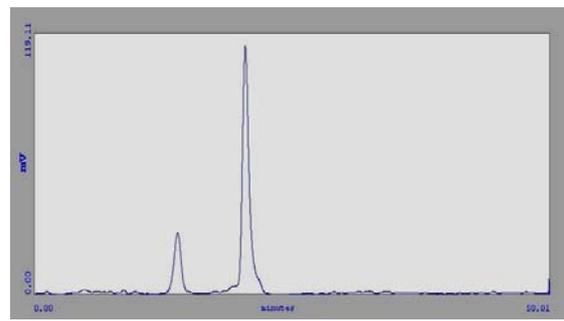
En el caso de la Fig. 8 (a) obtenida para la muestra experimental aparece un tiempo de retención de 14,18 minutos para la fracción correspondiente a proteínas detectable a 280 nm, y de 20,29 minutos para el AH, que representa un 99,38%.

La Fig. 8 b corresponde al cromatograma de intercambio iónico del AH utilizado como referencia. La fracción asociada a proteína aparece con un tiempo de retención de 14,15 minutos que representa un 22% del área total y una fracción mayoritaria correspondiente al AH con un tiempo de retención de 20,72 minutos que representa un 78% del material de partida.

Se encontró una similitud entre los tiempos de retención del AH de referencia y del AH experimental así como de la fracción proteica presente. No se encontró ninguna otra fracción detectable bajo estas condiciones experimentales que eluya



(a)



(b)

Figura 8 En el gráfico (a) se muestra el cromatograma de la muestra experimental y en el cromatograma (b) la sustancia empleada como referencia mediante el empleo de la cromatografía de intercambio iónico. Se empleó una columna Mono Q HR 5/5, utilizando solución tampón A de fosfato monobásico de sodio 50 mmol L^{-1} a pH 7 y B fosfato monobásico de sodio 50 mmol L^{-1} en NaCl 1 mol.L^{-1} y un gradiente desde 0 hasta 100% de (B) en 50 minutos.

a mayor fuerza iónica indicativa de la presencia de otros polisacáridos, sobre todo sulfatados muy comunes en estos tipos de tejidos (Göran y Rolf, 2003).

III.6.5 Análisis cualitativo por cromatografía de papel de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina en el AH purificado.

En la Fig.9 se presenta el cromatograma de papel, al aplicar de izquierda a derecha (1) AH purificado e hidrolizado y patrones de (2) ácido glucurónico, (3) glucosamina, (4) lactona del ácido glucurónico y (5) ácido galacturónico.

Se observan, las manchas correspondientes al ácido glucurónico, glucosamina, lactona del ácido glucurónico y ácido galacturónico de referencia con Rfs de 0,18; 0,35 ; 0,65 y 0,18 respectivamente, no detectándose diferencias en los tiempos de retención entre el ácido glucurónico y el ácido galacturónico.

En el caso de la muestra experimental, previamente hidrolizada se observaron manchas con Rfs similares a los obtenidos para el ácido glucurónico (Rf 0,18) y la glucosamina (Rf 0,35). El ácido glucurónico migra con Rf similar al ácido galacturónico y no se encontró ninguna mancha que indique la presencia de la lactona del ácido glucurónico debido posiblemente a problemas de sensibilidad de esta técnica, a pesar de realizar una hidrólisis en medio ácido en donde puede formarse de forma colateral la 3,6 gluconolactona.

No aparecen manchas con $R_f > 0,35$ que indique la presencia de otros tipos de unidades monosacáridicas como pudiera ser glucosa, galactosa, manosa etc. que son azúcares neutros que por referencias bibliográficas corren en cromatografía de papel a mayores Rfs.

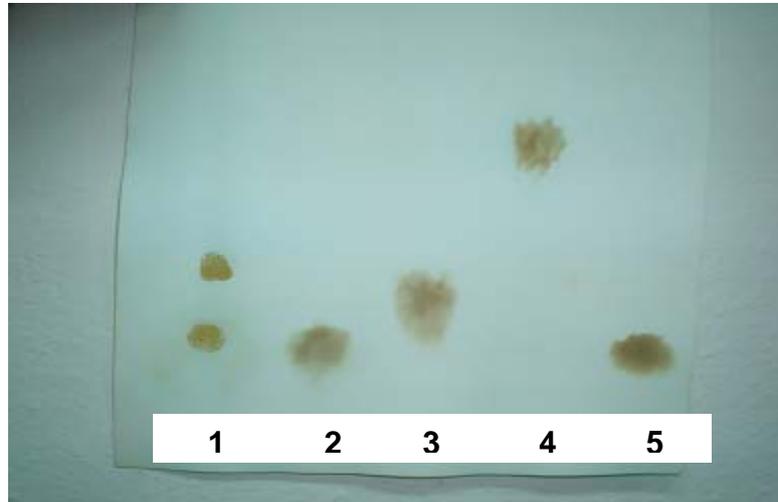


Figura 9. Cromatografía de papel ascendente obtenida del AH purificado sometido a hidrólisis con HCL 4 mol.L⁻¹. Se empleó como sistema de solvente n-butanol : piridina : HCL 0,1 mol. L⁻¹ (5:3:2)
(1)-Muestra experimental de AH hidrolizado (dos manchas, ácido glucurónico Rf 0,18 y la glucosamina Rf 0,35, (2)-Ácido glucurónico de referencia (Rf 0,18), (3) glucosamina Rf 0,35, (4)-lactona del ácido glucurónico Rf 0,65, (5)-ácido galacturónico Rf 0,18

Estos análisis por cromatografía de papel aunque no conclusivo permitieron identificar la presencia de ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina como unidades monoméricas, comparables con el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina constituyentes del AH purificado, complementando los valores obtenidos en los análisis colorimétricos cuantitativos informados en los epígrafes III.5.2 y III.5.3.

III.7 Análisis estructural del ácido hialurónico purificado. Espectroscopia infrarroja (IR) y de la Resonancia Magnético Nuclear (^{13}C - ^1H).

III.7.1 Espectroscopia infrarroja.

En cuanto al análisis IR (Fig.10) se observaron bandas características de polisacáridos a 3436 cm^{-1} asociada a estrechamientos en el plano de grupo O-H, a 2921 y 2853 cm^{-1} característica de estrechamientos C-H en el plano de grupos metilo, 1647 cm^{-1} que puede estar asociada a grupos carbonilos y a 1084 cm^{-1} aparece una banda de C-N alifático.

En el análisis infrarrojo descrito, se comparó el AH purificado (1) obtenido en el laboratorio con uno de referencia (2). No obstante aparecer bandas de absorción con valores de longitud de onda similares, las cuales pueden ofrecer un criterio que demuestre la presencia de esta molécula, este método no permite llegar a resultados concluyentes en cuanto a la estructura de la molécula del AH purificado, debido a que otros polisacáridos presentan espectros IR similares. Por lo tanto es necesario el empleo de técnicas de mayor especificidad, como son las técnicas de RMN ^{13}C y ^1H .

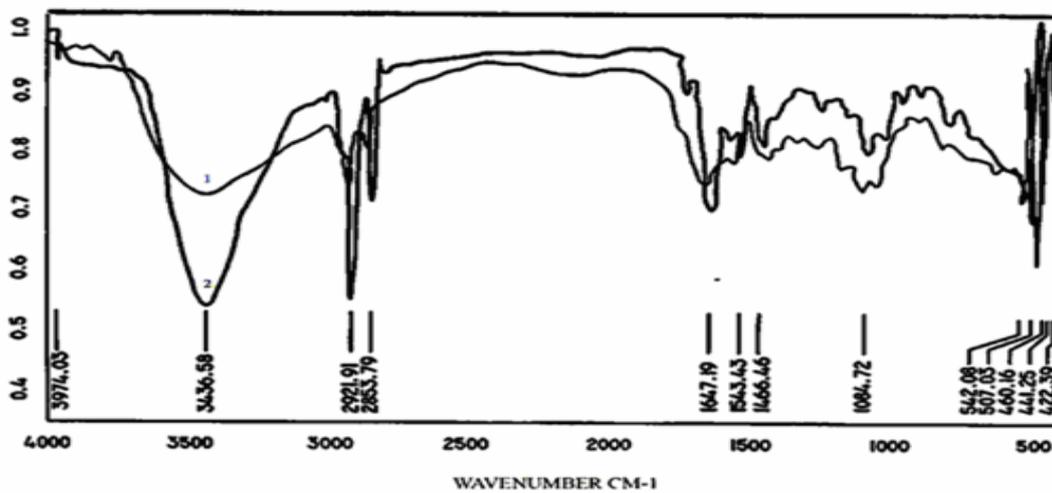


Figura 10 Espectros IR de la muestra experimental (2) y patrón de referencia (1). Estos espectros fueron obtenidos en un equipo modelo Broker en pastillas de KBr como medio dispersante.

III.7.2 Análisis de los resultados obtenidos mediante la espectroscopia de la Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C .

La espectroscopia de RMN ^{13}C y ^1H en polisacáridos ha sido una herramienta utilizada para identificar la configuración anomérica del enlace glicosídico. Los corrimientos químicos en RMN ^1H de las señales en los espectros dependen de la posición y alrededores químicos de los protones constituyentes de los monosacáridos que conforman al polisacárido. Dependiendo de la estereoquímica (posiciones ecuatoriales y axiales) en los diferentes isómeros se pueden diferenciar también los anómeros α ó β , si se tienen en consideración los valores de las constantes de acoplamiento H_1-H_3 . Por el elevado número de protones con similares alrededores químicos es que los espectros protónicos son muy complejos y difíciles de interpretar, por otro lado. Las técnicas de RMN ^{13}C brindan información de los carbonos esqueléticos y anoméricos, pero también de aspectos tales como la composición de monosacáridos, secuencia y conformación. Se conoce además que los grupos sustituyentes unidos a los átomos de carbono pueden causar variaciones significativas de los corrimientos químicos de este. La localización del enlace glicosídico es una de las mayores ventajas respecto a la protónica ya que ambos átomos de carbono son fuertemente desblindados y por tanto diferenciables respecto a los de los monosacáridos aislados.

Se realizaron dos espectros de RMN uno de RMN ^{13}C y otro $^{13}\text{C}-^1\text{H}$, estos se observan en las Fig. 11 y 12 respectivamente. En la Fig.11 se observa el espectro de RMN ^{13}C monodimensional del AH experimental. Aunque el espectro es algo

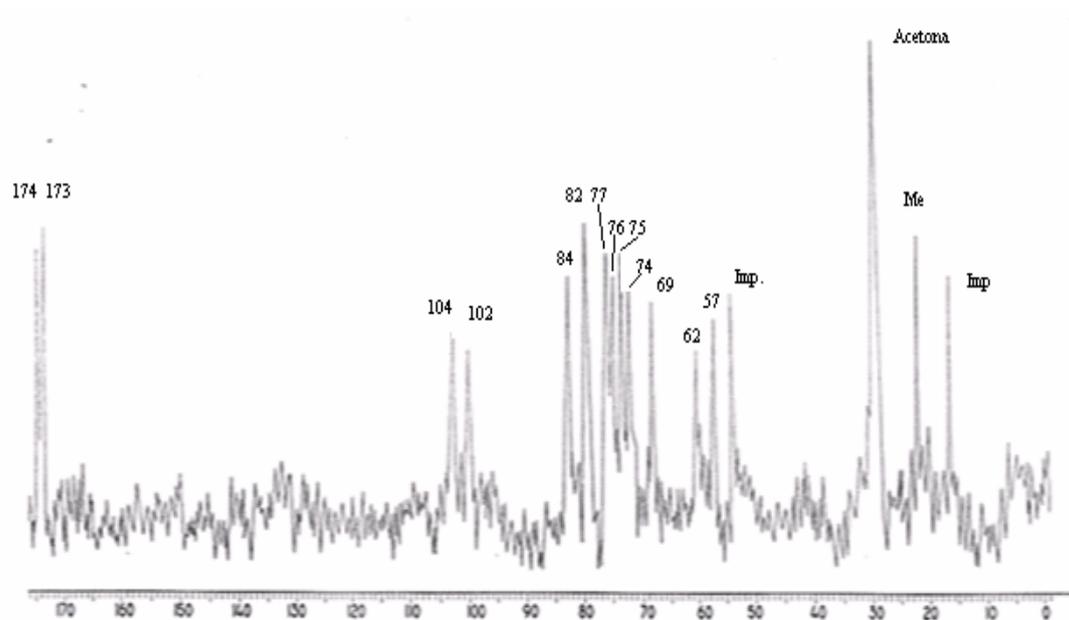


Figura 11 Espectro desacoplado RMN ^{13}C del ácido hialurónico, aislado y purificado según la metodología propuesta. Obtenido con un equipo modelo Bruker AC 250 F operado a 62,90 MHz. a concentración de 10 mg.mL $^{-1}$. Se muestran las señales y las asignaciones de los diferentes carbonos. Aparecen a 30 ppm la señal de la acetona, la señal a 22 ppm corresponde a los grupos metilo de la N-acetilglucosamina y las señales a 16 y 53 ppm son posibles impurezas de la muestra.

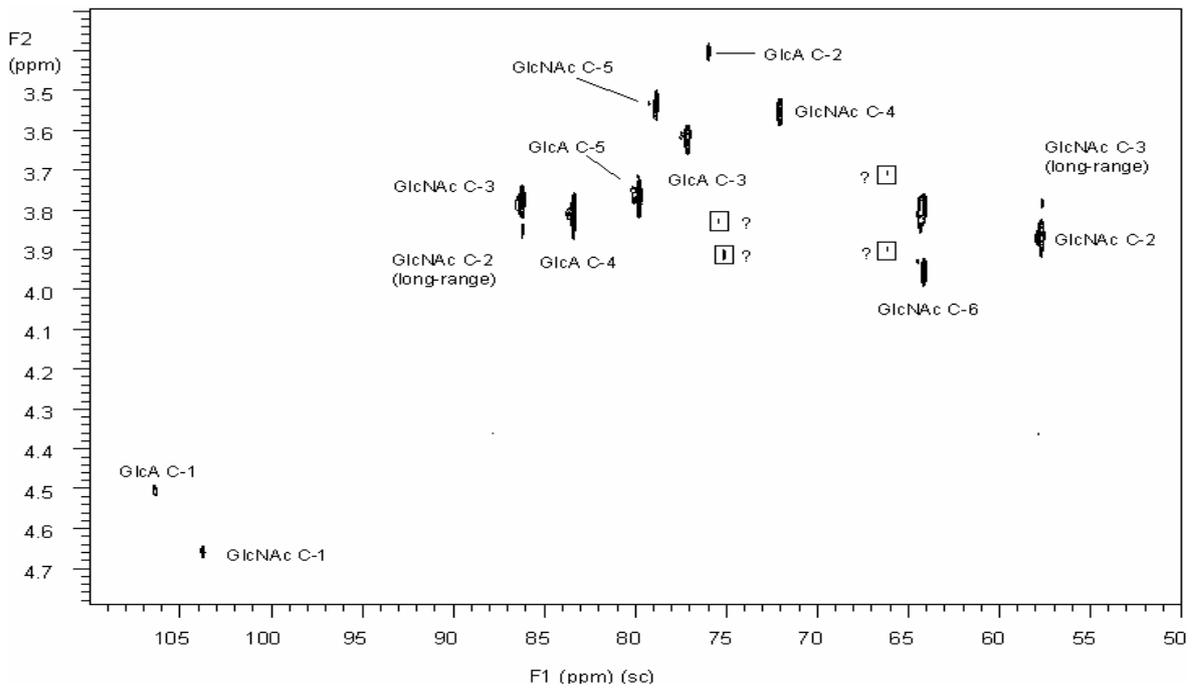


Figura 12 RMN ^{13}C - ^1H de la sal sódica del ácido hialurónico purificado. Este espectro fue obtenido a concentraciones de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en agua deuterada y sometida a tratamiento con ultrasonido. Se utilizó espectrofotómetro Varian 500, utilizando la técnica HSQC (Heteronuclear Singler Quantum Coherence).

ruidoso debido a las características de alta viscosidad del AH, se pueden observar las principales señales que caracterizan al AH experimental. En la Fig.12 se observa el espectro de RMN ^{13}C - ^1H y solo se muestran, las señales del esqueleto de las unidades monoméricas que conforman la estructura del AH experimental. En las técnicas de RMN bidimensional, cada pico en el diagrama de contorno informa sobre los desplazamientos químicos de los carbonos y los protones con los que están directamente enlazados. La técnica HSQC es más sensible que el RMN unidimensional, caracterizada por la transferencia de polarización desde los protones hasta los núcleos de ^{13}C .

En la tabla XVI aparece de forma comparativa los corrimientos químicos obtenidos mediante las técnicas de RMN ^{13}C y RMN ^{13}C - ^1H , tanto de la estructura del esqueleto de la molécula como el resto de la misma y se compara con lo informado en la literatura para el AH (Scott y Heatley, 1999).

Para asignar los corrimientos químicos de las señales de las dos unidades monoméricas que aparecen en la Fig. 11 y 12 además de tener en cuenta los criterios informados en la literatura (Scott y Heatley, 1999), se comparó con las señales de las α y β N-acetilglucosaminas obtenidas en ^{13}C (Saito y col, 1987) (Tabla XVI) y las principales señales informadas del espectro RMN ^{13}C del ácido β -poliglucurónico (Aono, 1990) cuyos corrimientos químicos también son reflejados en la tabla XVI.

De la tabla XVI se observa que hay una buena similitud con las principales señales de la β -N-acetilglucosamina. Hay una marcada diferencia que muestran un efecto desblindante, en el carbono anomérico de la glucosamina (C-1) a 102,00 ppm y

Tabla XVI Análisis de las principales señales obtenidas mediante técnicas de RMN ¹³C, RMN ¹³C-¹H, del AH purificado y aislado a partir de cordón residual y su comparación con resultados informados en la literatura.

Señales	Corrimientos químicos					
	AH exp. RMN ¹³ C ppm	AH Exp. RMN ¹³ C- ¹ H ppm		Ref.(Scott y Heatley, 1999) RMN ¹³ C	β- Ácido poliglucu rónico	β- (GlcNAc) (Saito y col ,1987)
		¹³ C	¹ H			
Carboxilato	173,4	-----	-----	174	173,80	-----
C=O acetamida	174,5	-----	-----	175	---	175,46
C1 (GlcAc)	104,0	106	4,51	104	102,2	-----
C1 (GlcNAc)	102,0	104	4,66	102	-----	96,03
Grupos metilo	22,1	-----	-----	21,0	-----	-----
C2 (GlcNAc)	57,0	57,0	3,80	55,0	-----	57,83
C3 (GlcNAc)	85,0	86,0	3,80	84,0	-----	75,00
C4 (GlcNAc)	69,0	72,0	3,54	69,0	-----	70,97
C5 (GlcNAc)	76,0	78,0	3,20	76,0	-----	77,01
C6 (GlcNAc)	62,0	63,0	3,96	61,0	-----	61,88
C2 (GlcAc)	74,0	75,0	3,40	76,0	72,9	-----
C3 (GlcAc)	75,0	77,0	3,62	77,0	75,2	-----
C4 (GlcAc)	82,0	84,0	3,82	82,0	80,5	-----
C5 (GlcAc)	77,0	79,0	3,74	75,0	75,6	-----

del C-3 (85,00 ppm) que indican las posiciones que se encuentran enlazados con la unidad monomérica del ácido glucurónico. El C-2 de a N acetilglucosamina en el AH experimental tiene un corrimiento químico de 57,5 ppm similar a la β N-acetilglucosamina, por el efecto del grupo amino acetilado en posición β hace que el corrimiento químico del C-2 de la unidad monomérica de la N-acetilglucosamina en el AH sea algo superior a la posición α y es una estructura característica del AH. Si se compara el corrimiento químico del C-5 del AH con las α y β N acetilglucosamina hay una similitud en los corrimientos químicos del C-5 del AH con el C-5 de la β -N acetilglucosamina.

En la tabla XVI se pueden observar las señales del grupo carbonilo de la N-acetilglucosamina a 176,00 ppm en el AH experimental que concuerda con lo observado en la β N-acetilglucosamina y con lo informado por Scott y Heatley (1999).

De forma similar ocurre con los corrimientos químicos de los diferentes carbonos de la unidad monomérica del ácido glucurónico. En la tabla XVI se observa los principales corrimientos químicos del resto de la molécula de AH. Hay una diferencia en los corrimientos químicos del C-4 del ácido glucurónico que se observa tanto en el espectro de RMN ^{13}C como RMN bidimensional y con lo informado en la literatura (Scott y Heatley, 1999) respecto al resto de los carbonos que constituyen la unidad monomérica del ácido glucurónico, esta diferencia está dada porque este se encuentra enlazado al C-1 de la unidad monomérica de la N-acetilglucosamina.

Desde el punto de vista estructural los espectros obtenidos del AH experimental aislado de cordones umbilicales residuales son similares al informado en la literatura.

La señal que aparece a 31 ppm es la referencia, en este caso de acetona y las que aparecen a 17 y 53 ppm pueden ser atribuibles a impurezas que pueden estar presentes en el polisacárido como son posibles péptidos.

III.8 Estudios de estabilidad del CAH.

El estudio se realizó en tres lotes consecutivos de CAH utilizando frascos plásticos de alta densidad (30 g por frasco) almacenándose en anaquel a temperatura de 2-8°C y realizando el mismo desde tiempo cero hasta dos años. Las mediciones del estudio de estabilidad del CAH se muestran en los gráficos que aparecen en las Fig. 13 en la cual mide el comportamiento de los azúcares reductores en el tiempo, Fig. 14 en la que se mide el pH en función del tiempo de almacenaje y la Fig. 15 las variaciones de la humedad durante el tiempo, obtenidos en tres lotes consecutivos de CAH aislado de cordón residual y evaluados en el tiempo.

El estudio tuvo en cuenta las regulaciones establecidas por el Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED, 2000). Éste debe realizarse en estante con el tiempo y no de forma acelerada. Existen estudios similares realizados por otros autores (Karen y Ellington, 1994) pero con el AH puro, en los cuales se recomienda estas temperaturas de almacenaje como las adecuadas para este polisacárido.

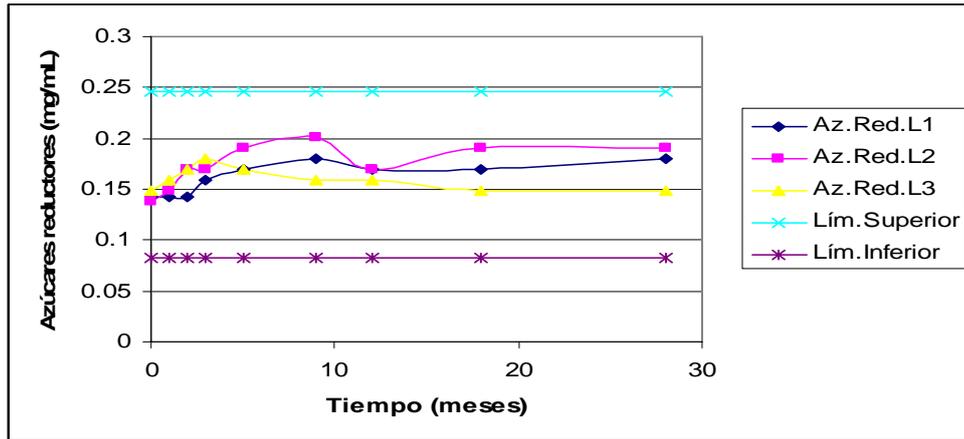


Figura 13. Variaciones en la composición de azúcares reductores en tres lotes consecutivos de AH crudo (CAH) durante el tiempo. En el gráfico aparecen los valores límites establecidos para los azúcares reductores en el CAH .

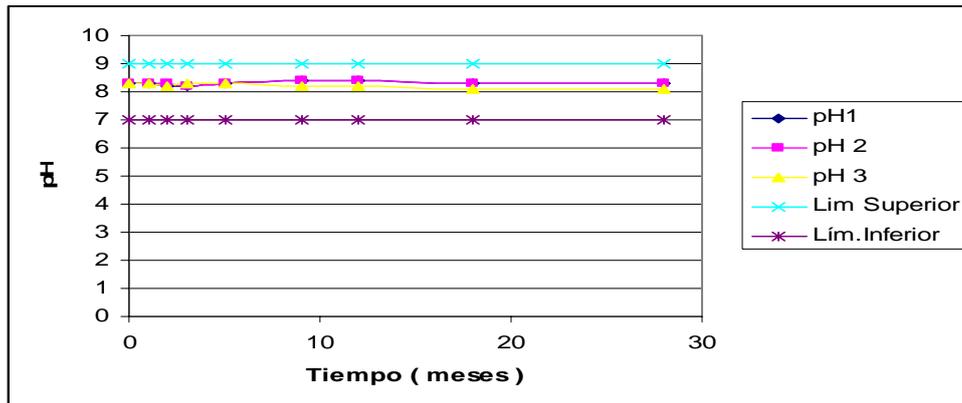


Figura 14 Variaciones en el pH de tres lotes consecutivos de AH crudo (CAH). Se presentan valores en los límites superior e inferior de (7 a 9 de pH). Las lecturas realizadas en solución al 1% se encuentran dentro de los límites establecidos.

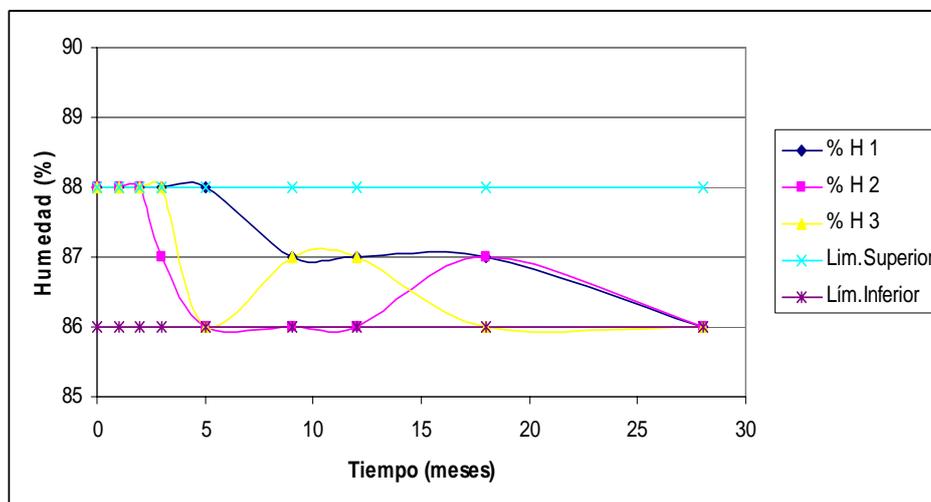


Figura 15 Variaciones de la humedad residual expresada en valores porcentuales de tres lotes consecutivos de AH crudo (CAH). Las líneas horizontales superior e inferior muestran los límites (86 y 88%) establecidos en el estudio de la humedad residual del CAH durante el tiempo.

Como se observa del gráfico de la Fig. 13 las variaciones en el contenido de azúcares reductores oscilan entre 0,15 y 0,20 mg.mL⁻¹ durante el tiempo. Las variaciones en el contenido de azúcares reductores se encuentran dentro del error de la técnica ($\pm 0,068$ mg.mL⁻¹). Las mediciones de reductores ofrecen criterio acerca de la estabilidad del CAH en el tiempo, ya que un incremento de los mismos, es un indicador de algún efecto degradativo del AH, no obstante debido a la posible presencia de otros azúcares que pueden estar presentes en el CAH es necesario realizar otros análisis que permitan ofrecer un mayor criterio de la estabilidad de este crudo.

En la Fig. 14 se observan los resultados de las mediciones del pH en función del tiempo en tres lotes consecutivos.

Las variaciones de pH observadas en la figura no afectan la composición química del producto, dado que en este rango el AH es estable a estos cambios (Karen y Ellington, 1994).

En la Fig.15 se observan las variaciones de la humedad residual en tres lotes consecutivos de AH crudo (CAH). No se observaron variaciones apreciables de la misma durante 28 meses.

Las mediciones de la viscosidad a 0,1% p/v en agua aparecen reflejadas en la Fig.16 en la cual se observó que esta oscila de 1,5 a 1,8 (cst), lo cual concuerda con los resultados de la literatura obtenidos en AH purificado bajo estas condiciones experimentales de medición y de almacenamiento (Karen y Ellington, 1994).

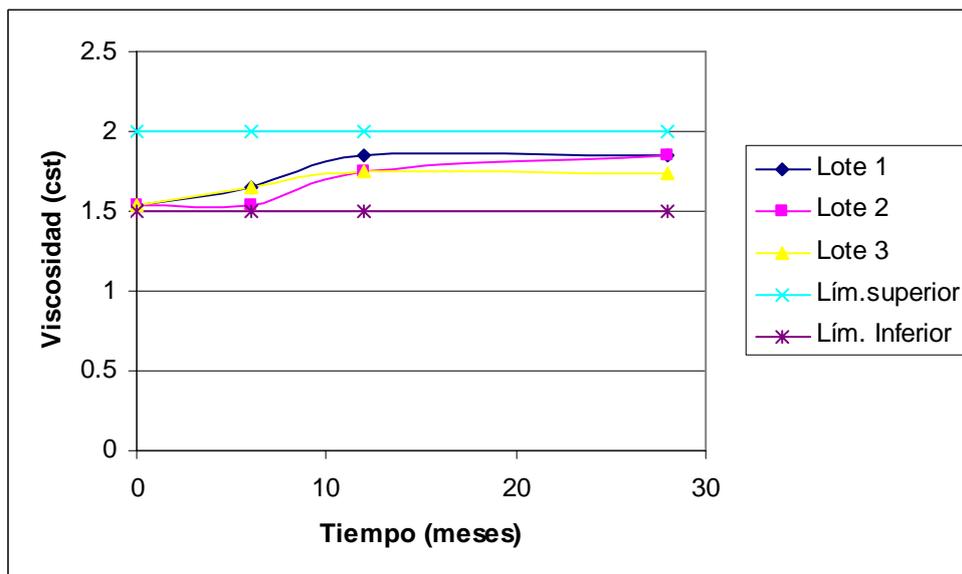


Figura 16 Mediciones de la viscosidad del CAH en disolución al 0,1% p/v a diferentes tiempos. Estas mediciones se realizaron disolviendo las muestras en solución al 0,1% p/v y midiendo en un viscosímetro capilar.

Si se compara los resultados de las mediciones de la estabilidad del CAH, bajo condiciones de refrigeración (temperaturas de 2-8°C) mediante los análisis de azúcares reductores y la viscosidad en el tiempo con lo observado en la literatura (Karen y Ellington, 1994), se encontró una similitud en cuanto al tiempo de estabilidad del AH (28 meses). No se tiene referencia de estudios de estabilidad realizados al CAH con esta composición, ni tampoco con el empleo de azúcares reductores como control analítico.

Se debe mencionar que se realizaron análisis del contenido de ácidos urónicos (bs) y proteínas a la hora cero y a los 28 meses de almacenado el CAH y se encontró al final del estudio, valores de un 2% de proteína y un 43% bs de ácidos urónicos. Por lo que no se detectaron cambios significativos en su composición.

Los análisis microbiológicos de estabilidad demostraron que éste se mantiene estable durante 28 meses al mantenerse los niveles de control microbiológico dentro de los parámetros establecidos. Se anexan los resultados del mismo. En la tabla XVII aparecen de forma resumida los diferentes indicadores desde 0 hasta 28 meses, como se puede observar de la misma, a pesar de hacer el estudio en tres lotes consecutivos en frascos plásticos de alta densidad, no obstante hay una reducción de la humedad residual y un ligero incremento de la viscosidad los cuales pueden ser explicados por las características del material de envase que por ser plásticos y a pesar de encontrarse cerrados tienen cierta porosidad y permiten que estos cambios ocurran.

Los resultados de la estabilidad del CAH, son comparables, con los estudios realizados por Karen y Ellington (1994) utilizando soluciones de hialuronato de

Tabla XVII. Resultados del estudio de estabilidad del CAH desde tiempo cero hasta 28 meses.

Indicador	Mes 0	Mes 28
Reductores (mg.mL ⁻¹)	0,15	0,20
pH	8,4	8,3
Humedad %	88,0	85,0
Viscosidad (cst)	1,54	1,81
Ácidos urónicos (% bs)	45,0	43,0
Proteínas %	2,8	2,0

Las muestras (tres lotes consecutivos), se almacenaron en frascos plásticos de alta densidad, a temperatura entre 2-8 ° C, realizando la estabilidad en el tiempo. Los frascos se abren y se toma cantidad suficiente de muestra, para realizar los análisis según se describe en el capítulo de materiales y métodos.

sodio puro en agua destilada. Estos autores demostraron que la viscosidad de las mismas no cambia a temperatura por debajo de 25°C, sin embargo disminuye drásticamente de forma exponencial decreciente con el incremento de la temperatura por encima de 25°C sobre todo a 80 - 90°C.

III.9 Análisis del etanol residual después de la precipitación del ácido hialurónico como fuente de AH de baja masa molar.

El AH de baja masa molar presente en el etanol residual como subproducto de la obtención del CAH, es de gran interés y se atribuye que el mismo está presente por la acción del solvente por lo que se teorizaba que en el etanol empleado en la precipitación del AH en disolución quedara el de menor masa molar y que es de utilidad.

Como regla general se utiliza el etanol como solvente para precipitar polisacáridos de elevada masa molar, sin embargo, después de obtener el CAH, el etanol residual resultante, debe contener AH con masa molar $\leq 10^5$ g.mol⁻¹ y numerosos han sido los autores que plantean a estas fracciones con una mayor actividad cicatrizante a pesar de que los efectos como antiinflamatorios y analgésicos se reducen como consecuencia de masas molares inferiores.

Los estudios de caracterización del etanol residual producto de la precipitación del AH en forma de CAH muestran lo siguiente:

- Se logró 4,8 L de etanol residual por cada Kg. de cordón umbilical residual procesado.
- Se obtuvo un líquido de color amarillo oscuro y olor característico. Con un contenido de etanol de un 60% v/v.

- Las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro UV/ VIS a una longitud de onda de 229 nm (como índice sugestivo de la presencia de AH) (Brun y col, 1990) mostró valores de 0,397, a 257 nm (0,117) y a 280 nm (0,104).
- Las mediciones cualitativas que indican la presencia de ácidos urónicos y N-acetilhexosaminas en el etanol residual dieron resultados positivos sugiriendo la presencia de estos monómeros en las fracciones de AH remanentes en el etanol residual. Para lograr este resultado como se conoce fue necesario eliminar el etanol mediante una diálisis y posteriormente la liofilización de la disolución para lograr una concentración adecuada según la sensibilidad de las técnicas de determinación de ácidos urónicos y hexosaminas sin ningún tipo de degradación, motivado por la baja concentración presente de AH de baja masa molar en el alcohol residual. En el caso del alcohol residual, aunque se detectó la presencia de N-acetilhexosamina la existencia de cierta cantidad de proteínas (0,02% p/v) interfiere el análisis de las hexosaminas desde el punto de vista cuantitativo.

El contenido de sólidos totales obtenido mediante liofilización en el etanol residual después de dializado, fue de 1,35. (100 mL)⁻¹ mL, después de reconstituido en 10 mL con agua destilada y realizado el análisis de cuantitativo de ácidos urónicos, el análisis de ácidos urónicos se determinó en 3.5 mg.mL⁻¹. Teniendo en cuenta que por cada unidad de ácidos urónicos existe una unidad de N-acetilhexosamina en la fracción dimérica

repetitiva, se puede calcular para este etanol residual, un valor porcentual de $0,7 \text{ mg.}(100 \text{ mL})^{-1}$ de GAGs en los que se encuentra el AH de baja masa molar.

- El contenido de azúcares reductores osciló de 0,2120 hasta 0,3180 mg. mL⁻¹. Estas cantidades son más elevadas que lo observado en el CAH y en el AH purificado, motivado por la presencia de fracciones de AH de más baja masa molar.
- Las lecturas de absorbancia a 280 nm y el análisis mediante el método de Bradford permitió calcular un contenido de proteínas de 0,216 mg.mL⁻¹.
- Este etanol residual, debe contener fracciones de AH de baja masa molar debido a que los polisacáridos, de alta masa molar, precipitan en medio etanólico, quedando en solución fracciones de baja masa molar de interés práctico. Esto se comprobó mediante determinaciones de la masa molar de éstos. En la Fig. 17 aparece el gráfico de ajuste de la K_{av} en función del log M empleando polisacáridos de baja masa molar de la firma Sigma. La ecuación de ajuste de la K_{av} vs log M fue $K_{av} = -0,2923 \log M + 1,4772$ con un $R^2 = 0,9813$. El Sephacryl S100 es un gel entrecruzado de forma covalente entre alil dextrana con N, N'-metilen bisacrilamida de alta resistencia mecánica y se emplea cuando se utilizó solventes orgánicos.
- En la Fig. 18, se presenta el cromatograma obtenido cuando se aplica 1 mL de muestra de etanol residual. Como se observa del gráfico anterior se obtiene una fracción entre 12 y 20 minutos así como un máximo a los 18 minutos correspondiente a una masa molar de $7 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

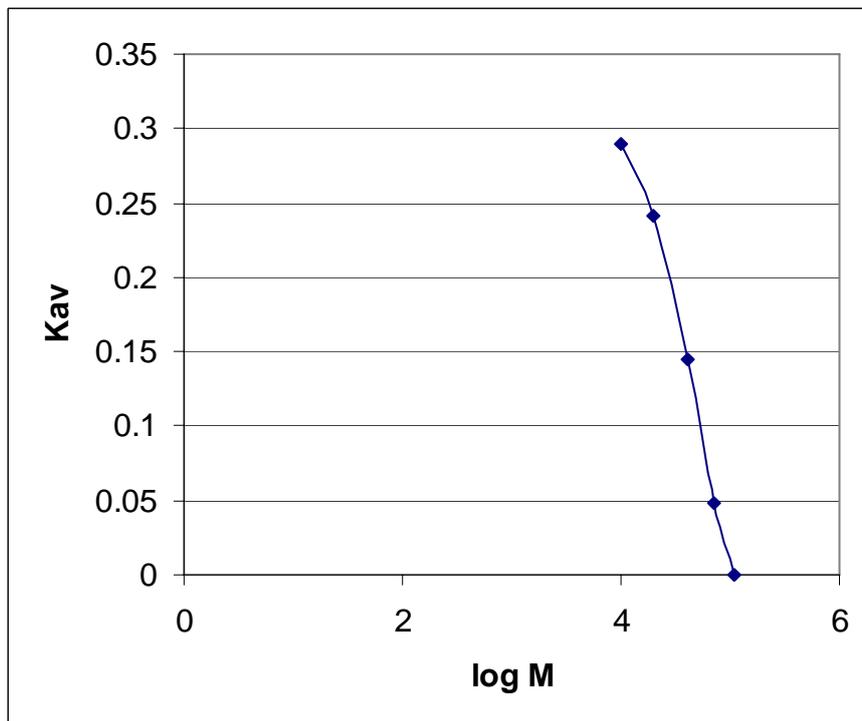


Figura 17. Gráfico obtenido a partir de una columna de Sephacryl S-100, equilibrada con una solución tampón de NaH_2PO_4 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ a pH 7, en donde se muestra la K_{av} en función del $\log M$, en donde M es la masa molar de polisacáridos. La ecuación encontrada fue $K_{av} = -0,2923 \log M + 1,4772$ con un $R^2 = 0,9813$. A partir de esta ecuación se determinó la masa molar del AH presente en el alcohol residual.

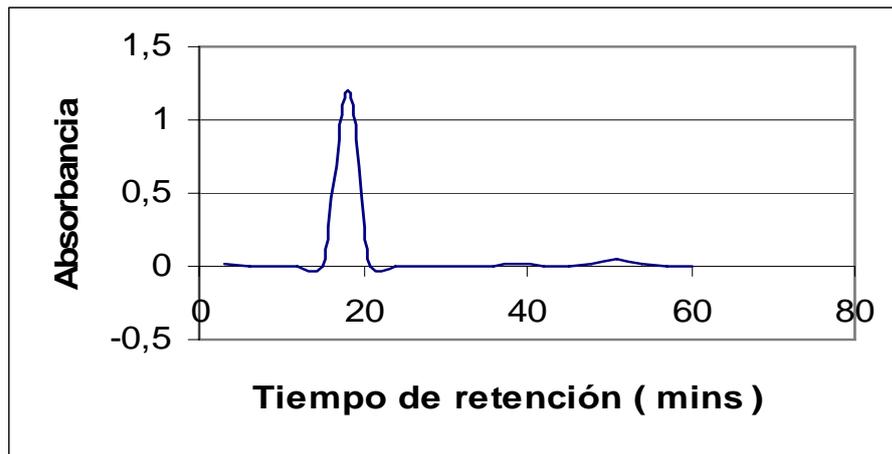


Figura 18 Cromatograma obtenido en el que se mide el valor del tiempo de retención en donde eluye la muestra de alcohol de AH. En el mismo se muestra la fracción eluída de la columna de Sephacryl S100, se obtiene una fracción entre 12 y 20 minutos así como un máximo a los 18 minutos correspondiente a una masa molar de $7 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

III.10 Discusión general

Las propiedades químicas y biológicas del Acido Hialurónico lo hacen atractivo para innumerables aplicaciones médicas, por tanto aunque ya se han descrito varias fuentes de obtención, aun se continúa trabajando en la búsqueda de alternativas que redunden en disminución de costos y simplificaciones en los procedimientos de obtención.

El uso del cordón umbilical como fuente de obtención de AH se había descrito anteriormente por Danishevsky y Bella (1966), sin embargo hasta el presente no se había concebido que una vez procesado para la obtención del principio activo del Gel Fotoprotector que se produce en el Centro de Histoterapia Placentaria para el tratamiento de la piel por quemaduras debido a la exposición prolongada a los rayos solares, conservara intacto el contenido de AH biológicamente activo.

Los resultados expuestos y discutidos hasta aquí confirman que lo que queda de cordón umbilical después de procesado para la elaboración del Gel Fotoprotector resulta ser una materia prima adecuada para la preparación de un crudo de Acido Hialurónico de aplicación en la formulación de un gel para la cicatrización de heridas abiertas (Oruña y col, 2006) y como antiinflamatorio de uso tópico, a pesar de que el procedimiento de elaboración del Gel Fotoprotector, por sus características, pudiera provocar la pérdida o degradación del resto de otras biomoléculas de interés terapéutico como es el caso del Acido Hialurónico.

Como objetivos específicos para demostrar la hipótesis de esta tesis se concibió la preparación de un crudo de Acido Hialurónico a partir de cordón umbilical residual, su caracterización química y comparación con el que se obtiene a partir del cordón

virgen. La caracterización químico-física del AH contenido en el crudo corrobora fehacientemente que el cordón residual que antes se consideraba como desecho ahora pasa a ser una materia prima apropiada para la obtención de esta biomolécula.

Una ventaja experimental, es que los cordones residuales son más fáciles de manipular que los cordones convencionales, dado que el tratamiento previo con solventes orgánicos cambia su consistencia facilitando los procesos de molinado, extracción, filtración y centrifugación. El contenido proteico del cordón umbilical residual es mayor que el cordón umbilical convencional (Tablas V y IX), sin embargo los resultados experimentales, muestran que el CAH obtenido a partir del cordón residual presenta un contenido de proteínas más bajos en comparación con el del CAH obtenido a partir del cordón umbilical humano. De aquí se deduce que a la concentración salina del tampón de extracción, las proteínas no pueden difundir fuera del tejido de la misma forma como ocurre en el cordón umbilical humano. Sin embargo se demuestra que no ocurre lo mismo con los carbohidratos y en particular con la fracción de GAGs, en los cuales se logró un 93% de recuperación ($1,2 \text{ g.Kg}^{-1}$) de AH respecto a la cantidad teórica estimada según reportes de la literatura para cordones umbilicales ($1,3 \text{ g.Kg}^{-1}$).

En cuanto a los rendimientos, en el procedimiento propuesto empleando cordones residuales se obtiene $1,2 \text{ g AH base seca.Kg}^{-1}$ de material de partida mientras que lo informado por la metodología de Balazs (1979) a partir de crestas de gallo fue solo ($0,79 \text{ g.Kg}^{-1}$). La disponibilidad de cordones umbilicales en comparación con las crestas de gallos, inclina la balanza hacia el empleo de los cordones

residuales partiendo de poder contar con una planta de producción en donde se reciben y procesan las placentas humanas, de acuerdo al programa de recogida de éstas en todo el país.

Algunos autores teniendo en cuenta la complejidad del material de partida para la purificación de AH, han utilizado el clorhidrato de guanidinio o urea, para extraer los proteoglicanos conjuntamente con proteínas y ácidos nucleicos, como es el caso de los trabajos realizados a partir del fluido sinovial, combinado con el empleo del trifluoroacetato de cesio o cloruro de cesio para gradientes de centrifugación. El uso de cloruro de guanidinio o urea provoca la desnaturalización de las proteínas lo que se traduce en alteraciones de las propiedades químico-físicas de éstas como puede ser la reducción de la viscosidad de sus soluciones lo que permite una mejor separación de los polisacáridos, empleando gradientes de centrifugación (Wannarat y col, 2003). Otros autores (Sunwoo y col, 1998) aprovechan el efecto desnaturalizante del clorhidrato de guanidina sobre las proteínas para separar los proteoglicanos del resto de otras sustancias contaminantes, empleando cromatografía de intercambio iónico y posterior filtración por gel empleando. La complejidad de estos métodos en comparación con el utilizado empleando el cordón residual como materia prima, está dada por la naturaleza de las fuentes de obtención, por ejemplo el fluido sinovial o la zona de maduración de condrocitos, en la que la presencia de otros contaminantes en mayor proporción hace que los métodos de aislamiento y purificación sean mucho más complejos y por tanto costosos. Debe señalarse que los rendimientos son

relativamente bajos dada la naturaleza de las fuentes de obtención (Devaraj y col, 1992) y en dependencia del uso a que se encuentra destinado.

El empleo de solución de CTAB al 1% p/v como agente precipitante del AH resulta de interés por cuanto, convencionalmente se ha utilizado el cloruro de cetilpiridinio (CPC) al 1% p/v, como reactivo para la precipitación de GAGs (Schiller, 1961; Danishevsky y Bella, 1966; Balazs, 1979). Para la disociación de los complejos formados entre CTAB-GAGs se observó que a concentraciones de cloruro de sodio 0,4 mol. L⁻¹, se rompe el complejo formado por el AH con el CTAB, sin embargo referencias bibliográficas indican que a estas concentraciones salinas, no debe romperse la mayor parte de los complejos de CTAB con los polisacáridos sulfatados como es SCh, SH, SQ etc, que pudieran estar presentes en el cordón residual debido a una mayor fortaleza del complejo con CTAB precisamente por la presencia de los iones sulfato en estos polisacáridos. En el caso del complejo formado entre los ácidos nucleicos y el CTAB, la concentración salina de cloruro de sodio 0,4 mol.L⁻¹, tampoco permite disociarlos dentro de ciertos valores (Murray y Thompson, 1980). Esto facilita eliminar en un tercer paso una gran parte de los AN, de una forma mucho más sencilla. La eliminación total se completa con la adición de un 25% de etanol v/v antes de la precipitación del AH en forma cruda. Por otra parte el CTAB es un reactivo no tóxico en comparación con el CPC (Garner y Papworth, 1977).

Si se compara la metodología propuesta con los métodos informados por otros autores (Balazs, 1979; Brun y col, 1990) se utilizan menores volúmenes de solventes orgánicos, no se requiere del empleo de enzimas proteolíticas (pepsina

o tripsina), ni sales como el sulfato de amonio para eliminar proteínas contaminantes que si son empleadas por otros autores (Kvan y col, 1993; Nakano y col, 1994; Sherman y col, 1994).

Con esta metodología se logra un producto (AH) con una masa molar media de 5×10^5 hasta 2×10^6 g.mol⁻¹ con una $K_d \leq 0,24$ para un 80% de material polisacárido purificado. El AH extraído del tejido mantiene sus principales características estructurales y las interacciones intermoleculares e intramoleculares en solución tampón fisiológico al 1%, expresado en términos de viscosidad cinemática. Los resultados comparados con la literatura así lo confirman (Balazs, 1979; Beaty y col, 1985; Motohashi y Mori, 1988; Orvisky y col, 1992; Sunwoo y col, 1998).

Los análisis de ácidos urónicos y de N-acetilhexosaminas, además de los estudios ulteriores que se discuten en esta tesis sobre purificación, caracterización estructural del AH (RMN ¹³C y RMN ¹³C-¹H además de la espectroscopia IR), son una confirmación de la presencia de este polisacárido como componente biológicamente activo en el CAH aislado de cordón residual, y por ende no afectado durante el proceso de obtención del Gel Fotoprotector a partir del cordón umbilical humano.

El CAH se pudiera emplear para la protección de las lesiones de la piel por agentes químicos o por el calor, humectando la misma y produciendo una protección efectiva contra la pérdida de agua en las lesiones, el que se aplicaría en formulaciones de uso tópico. Por su composición química el CAH puede tener uso como cicatrizante, sobre todo en formulaciones en forma de geles o cremas.

Oruña y col (2003 a y b), ha evaluado el CAH elaborado mediante este procedimiento, en forma de geles a diferentes concentraciones porcentuales, para el tratamiento de heridas abiertas utilizando animales de experimentación, con resultados alentadores, los estudios de dosis realizados, han demostrado que la formulación al 4% p/p es la de mejor efectividad por su acción cicatrizante después de un análisis morfológico e histopatológico realizado por los mismos autores (Oruña y col, 2006) resultados similares han sido informados con el empleo del AH como acelerador de la cicatrización (Nakamura y Nishida, 1994; Oksala y col, 1995), pero nunca en el tratamiento de heridas abiertas. Este aspecto resulta novedoso por la posibilidad de emplear el CAH para el tratamiento de tales lesiones entre las que se puede mencionar las úlceras venosas o flebostáticas con una incidencia en el país de 8 por cada 1000 habitantes (Quiñones, 2006). En fecha reciente otros autores (Miyares y col, 2006) lo han utilizado en formulación de jabones para el tratamiento del acné, con buenos resultados. El comportamiento viscoelástico del AH lo hace ideal para su empleo en cirugía oftálmica y en ortopedia. Otras aplicaciones de este producto purificado, por sus características debidamente demostradas, pudiera ser utilizado en la prevención de la formación de tejido fibroso cuando se aplica en el espacio sinovial en artritis traumática, osteoartritis y bursitis, además puede ser empleado para separar superficies tisulares con acción viscoelástica en operaciones de cirugía de la retina, la cornea e implantes de lentes debido a que en primer lugar sirve como una protección mecánica durante la manipulación del tejido y segundo

no produce inflamación (Balazs, 1979; Balazs, 1983; Itosaku y Matsunaga, 1995; Marshall y col , 2000; Chenevier y col , 2004).

Como sub-producto de la obtención del CAH queda un alcohol residual con un contenido de 0,7 mg de GAGs (como ácido urónico) por cada 100 mL de alcohol. Como se ha discutido en la revisión bibliográfica, la acción cicatrizante del AH es marcada en las fracciones de masa molar $< 5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, (Jordán, 1979; Nakamura y Nishida, 1994; Vercruysse y col, 1994; Bertheim y Helltrom, 1994; Brismar, 1995; Oksala y col, 1995; Lesley y col, 1997). La presencia de fracciones de AH de masa molar inferiores a $5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ resulta de interés práctico pues su obtención sería mucho más simple que la informada en la literatura (Callegaro y Reinier, 2000; Yamaguchi, 1995). Este alcohol residual se ha utilizado en la formulación y comercialización de una loción para después de afeitar la cual ha sido registrada en el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos con el Número de Licencia Sanitaria R 051/00-IV (anexos). Además este alcohol puede ser materia prima para elaborar otros productos de interés dentro de la industria dermocosmética como por ejemplo la posible formulación de un gel y una loción antiacné.

Todo lo anteriormente expuesto lleva a proponer al cordón umbilical residual que queda de la obtención del Fotoprotector elaborado en el Centro de Histoterapia Placentaria como un material de partida más adecuado para la extracción y purificación del AH.

III.11 Aplicaciones generales del CAH, AH purificado y el alcohol residual que queda de la precipitación del CAH.

A partir del procedimiento propuesto se han logrado 3 materias primas que son:

El CAH, el alcohol residual que queda de la precipitación del CAH y AH purificado.

En la tabla XVIII se presentan de forma general los rendimientos que se obtienen de CAH, de AH y de etanol residual partiendo de 1000 g de cordones umbilicales residuales.

En el caso del CAH, su utilidad practica esta dada por sus posibilidades de empleo como cicatrizante, según resultados referidos por otros autores que lo han empleado, demostrándose que contiene AH de elevada masa molar de ahí su posible efecto antiinflamatorio (DellaValle y col, 1995) . Es de esperar que sea de utilidad, para el tratamiento de afecciones tales como úlceras venosas o flebostáticas, en el tratamiento de quemaduras, heridas producidas por lesiones, tratamiento tópico de procesos inflamatorios etc.

Este crudo de CAH podría ser una fuente para obtener jabones dérmicos para el tratamiento del acné.

En el caso del etanol residual, el Centro de Histoterapia comercializa una Loción para después de afeitar la cual se encuentra registrada y tiene gran aceptación por contener AH de baja masa molar con acción cicatrizante.

En el caso del AH purificado aunque no se ha logrado la forma estéril terminada del mismo en forma de viscoelástico al 1%, se cuenta con un procedimiento que permite aislar AH para lograr viscoelásticos que para ser empleados en oftalmología y ortopedia.

Tabla XVIII. Resumen general de los rendimientos obtenidos a partir 1000 g de cordón umbilical residual.

Material de partida	Cantidad o rendimiento	Rendimiento teórico (g)
Cordones umbilicales residuales (g)	1000	---
CAH (g)	50	---
AH (g.Kg ⁻¹)	1,2 (93% bs)*	1,3
Alcohol residual (L)	4,8	---

* Este por ciento esta relacionado con la cantidad teórica que puede esperarse a partir del cordón umbilical residual.

III.12 Contribución a la evaluación del efecto económico al introducir el procedimiento de obtención de AH en forma de CAH y el etanol residual.

El Acido Hialurónico se comercializa internacionalmente entre otros por la firma LabDepot a un precio de 435.84 USD/g o se emplea alternativamente como gel cicatrizante en heridas abiertas (Oruña y col, 2006). A partir de los resultados del procedimiento de obtención del crudo que contiene AH (CAH) a nivel de laboratorio, y el aprovechamiento del etanol residual y el AH purificado, se propone al CAH como materia prima para obtener AH purificado. Se realiza una prefactibilidad económica para la elaboración del CAH y el etanol residual en la Planta de Histoterapia Placentaria.

A nivel de laboratorio se pueden procesar 2 Kg de cordón residual cada 3 días con rendimiento general de 100 g de CAH. En la tabla XIX aparece reflejado el número de trabajadores para elaborar 100 g de CAH a nivel de laboratorio, en la tabla XX los gastos por reactivos necesarios para la producción y en la XXI los consumos energéticos atendiendo a los dos equipos principales que se emplean. El costo a nivel de laboratorio para elaborar 100 g de CAH resultó ser de 79.17 pesos (suma de MN y CUC).

A partir de CAH, se puede obtener un gel con actividad cicatrizante. Este puede ser un paliativo a la falta de medicamentos para el tratamiento de úlceras venosas o flebostáticas. No se tiene referencia del uso de un crudo con las características del CAH para ser empleado como materia prima en la formulación de geles cicatrizantes de heridas abiertas (Oruña y col, 2006). El país no cuenta con ningún medicamento para el tratamiento de úlceras venosas cuya incidencia está alrededor de 8,0 por cada 1000 habitantes. La

Tabla XIX. Gastos en salarios para producir 100 g de CAH a nivel de laboratorio.

	Cant. de trabajadores	Categ. Ocup.	Grupo Escala	Salario/Horas /Categoría y Grupo	Norma de Tiempo (Horas)	Gasto de Salario
Técnico en Control biológico	1	T	Res. 76/05	2.2350	24	53.64

Tabla XX Gastos en reactivos para producir 100 g de CAH a nivel de laboratorio.

PRODUCTO	U.M.	NORMA DE CONSUMO	PRECIO	IMPORTE C.U.C	IMPORTE M.N.	IMPORTE TOTAL
Cloruro de sodio	g	74	0.023	1.70	-	1.70
CTAB	g	12	1.68	20.16	-	20.16
Alcohol fino A	L	7	0.4505	-	3.15	3.15

Tabla XXI Consumo energético para producir 100 g de CAH.

Equipos	Consumo en Kw. (hora) ⁻¹ en equipos.	Precio Kw.(hora) ⁻¹	Tiempo total (horas)	Importe energético
Agitador mecánico	0,07	0.078200	24	0.1314
Centrifuga	2,50	0.078200	2	0.3910

Tabla XXII Gastos en materias primas para producir 2,4 g de AH purificado a nivel de laboratorio.

PRODUCTO	U.M.	NORMA DE CONSUMO	PRECIO	IMPORTE		IMPORTE TOTAL
				IMPORTE CUC	IMPORTE MN	
Cloruro de sodio	g	4	0.023	0.092	-	0.092
cloroformo	L	0,6	28.16	16.9	-	16.9
Alcohol fino A	L	7	0.4505	-	3.15	3.15
Acetona	L	0,150	28.4	2.84	--	2.84
CAH	g	100	0.79	21.86	57.31	79.17

úlceras venosas es una de las patologías relacionadas con heridas abiertas de más difícil pronóstico.

Por otra parte, de la obtención de 100 g de CAH se generan 9,6 L de etanol residual que contiene 0,7% p/v de GAGs de baja masa molar. Este etanol residual es empleado en la formulación de una loción para después de afeitarse la cual se encuentra registrada en el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

Así también, a partir de 100 g de CAH se puede obtener 2,4 g de AH purificado a nivel de laboratorio. Los costos considerando solamente reactivos vienen descritos en la tabla XXII.

En el caso del AH purificado, se obtuvo inicialmente con el objetivo de demostrar su presencia en el CAH. Pero al mismo tiempo sirvió de base al desarrollo de un procedimiento que permite su obtención con mayores rendimientos, a costos inferiores, y con características fisicoquímicas similares a los comercializados. El AH purificado tiene potencialidades de ser empleado en formulaciones viscoelásticas.

El precio de 1 g de AH purificado es de 435.84 USD (Lab Depot, 2005). Teniendo en cuenta los costos según materias primas (Tabla XXII), la elaboración de 1 g de AH purificado a nivel de laboratorio se encuentra alrededor de 42.56 pesos.

El CHP Planta recibe 15 toneladas de placenta como promedio al año y después de elaborar el Gel Fotoprotector queda un residuo de cordón umbilical de un 30% (225 Kg) que se cremaba y no tenía valor práctico.

Prefactibilidad Técnico Económica de la Producción de CAH y el etanol residual en la Planta de Histoterapia Placentaria.

Mediante la determinación de una ficha de Costos se ha preparado el estudio de prefactibilidad de la producción de CAH y el etanol residual a nivel de la Planta de Histoterapia Placentaria, teniendo como base los datos obtenidos a escala de laboratorio.

Como rendimiento del proceso se considera la obtención de 12 kg de CAH y un alcohol residual que contiene AH de baja masa molecular equivalente a 1080 L. Teniendo en cuenta todos los gastos en que se incurriría en la Planta para obtener estos dos productos se elaboró la Ficha de Costos que se presenta en las Tablas XXIII y XXIV.

En cuanto a las materias primas, se relacionan en la Tabla XXIV de desagregación material todos los productos empleados así como sus índices de consumo, precios actuales y costos totales.

Se destacan los costos unitarios al final de la Ficha de Costos considerando como unidad el volumen del envase utilizado para cada producto de salida del proceso (CAH o etanol residual).

Se tienen en cuenta todos los gastos en moneda convertible (CUC) para la producción y se refleja como moneda total la suma de moneda nacional más divisa.

El costo de las materias primas y materiales representa el 92% del costo total de producción, sin incluir los envases.

Resultados económicos:

Con el producto obtenido como CAH, se tiene una materia prima para la elaboración posterior de un gel cicatrizante que después de formulado permite

Tabla XXIII FICHA PARA DETERMINAR EL COSTO Y SU COMPONENTE EN PESOS CONVERTIBLES

EMPRESA : CHP		DESCRIPCION DEL PRODUCTO: CAH y Etanol residual		
Consejo Estado				
COSTO TOTAL (Sin envase)		3509.61		
COMPONENTE EN DIVISAS (Sin envase):		2771.79		
VOLUMEN DE PRODUCCION EN LA FICHA DE COSTO: 12 Kg de CAH y 1080 L de etanol residual.				
CAPACIDAD DE PRODUCCION	Procesar 225 kg de cordón residual			
CONCEPTOS DE GASTOS		FILA	MONEDA TOTAL	MONEDA CONVERTIBLE
MATERIAS PRIMAS Y MATERIALES		1	3222.66	2761,14
MATERIAS PRIMAS Y MATERIALES		1,1	3181.68	2761.14
COMBUSTIBLES Y LUBRICANTES		1,2	-	-
ENERGIA ELECTRICA		1,3	13.98	-
AGUA		1,4	27.00	-
SUBTOTAL (GASTOS ELABORACION)		2	286.95	10.65
OTROS GASTOS DIRECTOS		3	0.35	0.35
DEPRECIACION		3,1	-	-
ARRENDAMIENTOS DE EQUIPOS		3,2	-	-
ALIMENTACION (TRAB. DIRECTOS)		3,3	0.35	0.35
GASTOS DE FUERZA DE TRABAJO		4	161.55	0.00
SALARIOS		4,1	128.00	-
VACACIONES		4,2	11.64	-
CONTRIBUCION A LA SEG. SOCIAL (14 %)		4,3	19.55	-
IMPUESTO A LA ONAT		4,4	2.36	-
ESTIMULACION EN DIVISAS		4,5	-	-
GASTOS INDIRECTOS PRODUCCION		5	0.00	0.00
DEPRECIACION		5,1	-	-
MANTENIMIENTO Y REPARACION		5,2	-	-
GASTOS GENERALES DE ADMON.		6	126.78	10.30
COMBUSTIBLE Y LUBRICANTES.		6,1	10.30	10.30
ENERGIA ELECTRICA		6,2	-	-
DEPRECIACION		6,3	-	-
ROPA Y CALZADO		6,4	-	0.00
ALIMENTOS		6,5	-	0.00
OTROS (COEF. IND. DEL CENTRO)		6,6	116.48	-
GASTOS TOTALES O COSTO DE PRODUCCION		7	3511.33	2771.79
COSTO ESTIMADO PARA EL CAH (97 %)		8	3405.99	2688.63
COSTO ESTIMADO PARA ETANOL RESIDUAL (3%)			105.34	83.15
COSTO DE ENVASE DEL CAH		9	31.20	31.20
COSTO DE ENVASE DEL ETANOL RESIDUAL			149.04	137.70
COSTO TOTAL DE CAH		10	3437.19	2719.83
COSTO TOTAL DEL ETANOL RESIDUAL			254.38	220,85
Costo unitario del CAH	(1 Kg)	11	286.43	226.65
Costo unitario Etanol residual	(20 litros)	12	4.71	2.21

Tabla XXIV Desagregación material

PRODUCTO	UM	Indice de consumo	PRECIO VIGENTE	CONSUMO TOTAL	COSTO TOTAL	COSTO ENVASES		COSTO TOTAL	
						TOTAL	DIVISA	TOTAL	DIVISA
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COMBUSTIBLES									
ENERGIA								13,98	0,00
ELECTRICIDAD	kwh		0,08	178,80	13,98			13,98	
MATERIAS PRIMAS Y MATERIALES								3181,68	2761,14
Residuos de cordones	kg	225,00	0,00	0,00	0,00			0,00	0,00
Cloruro de sodio	g	740,00	0,02	8880,00	204,24			204,24	204,24
CTAB	g	120,00	1,68	1440,00	2419,20			2419,20	2419,20
Alcohol "A" Etanol	L	70	0,45	840,00	378,00			378,00	0,00
ENVASES									
Envases de 20 L	20 L		2,76	54,00	149,04	149,04	137,70	149,04	137,70
Envases de 1 L	L	1,00	2,60	12,00	31,20	31,20	31,20	31,20	31,20

disponer de un volumen equivalente a 12000 tubos de 25 g. Al determinar el costo que representa este producto dentro de una formulación cicatrizante, asciende a 0.29 pesos por tubo de 25 g. Con el etanol residual actualmente se dispone de una formulación al 14% v/v en forma de loción para después de afeitar, que se vende a 6 CUC en el mercado de divisas, el costo de esta materia prima en esa formulación sólo representa 1 centavo por frasco de 250 mL.

Con la obtención de 12000 tubos de 25 g, se abastecería el 75% de las necesidades del país, conociendo que se aplica como dosis promedio 1 g por paciente semanal durante 5 semanas.

Si se fuera a elaborar como AH, se puede estimar que a partir de 12 Kg de CAH se puede lograr 288 g de AH. Si se elabora en forma de gel viscoelástico al 1% p/v, se puede obtener 14400 bulbos de 2 mL para uso oftálmico. Comparable con el Healon de la firma Amersham Biosciences, que se comercializa a un precio 30 USD por bulbo de 2 mL para ser utilizado con fines oftálmicos.

Estas alternativas de producciones serían un paliativo a los problemas de falta de medicamentos de producción nacional, para el tratamiento de úlceras venosas así o como una fuente para elaborar AH de uso en oftalmología. Todo a partir de un residual contaminante de la producción del Gel Fotoprotector (cordon residual) que ahora pasaría a convertirse en una nueva materia prima.

IV. CONCLUSIONES.

IV.CONCLUSIONES.

- 1- Se desarrolló un procedimiento para la obtención de un crudo que contiene Ácido Hialurónico (CAH) biológicamente activo, a partir de cordones umbilicales residuales de otras producciones biofarmacéuticas con rendimientos superiores al de otras fuentes y otros procedimientos conocidos.
- 2- Fue posible aislar y purificar Ácido Hialurónico químicamente puro a partir del CAH biológicamente activo.
- 3- Las propiedades físico-químicas del producto purificado demuestran que el Ácido Hialurónico obtenido fue totalmente estable a los procedimientos aplicados, comparable con otros productos comerciales y podría ser empleado en oftalmología y ortopedia como producto de mayor valor agregado.
- 4- El alcohol residual que queda del proceso de obtención del CAH es una fuente de Ácido Hialurónico de baja masa molar con otros usos farmacéuticos y cosméticos.

V. RECOMENDACIONES.

V. RECOMENDACIONES.

- 1- Realizar los trámites para la ejecución de un ensayo clínico en úlceras venosas, con vistas a registrar el Gel de CAH al 4% como cicatrizante de heridas abiertas.
- 2- Proponer el escalado del procedimiento descrito en las instalaciones del Centro de Histoterapia Placentaria. Planta.
- 3-Promover la explotación del Ácido Hialurónico a partir de los cordones residuales para la producción industrial de productos de interés médico farmacéutico y cosmético.
- 4- Realizar los estudios de desarrollo de una metodología para la obtención de Ácido Hialurónico purificado en forma de gel viscoelástico estéril.

VI. AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS.

VI. AUTOBIBLIOGRAFIA RELACIONADA CON LA TESIS

Publicaciones

- 1. Lago G., Oruña L., Coto G.,** “Aislamiento de polisacáridos a partir de cordones umbilicales humanos”.*Revista Cubana de Farmacia* 36(3) 182-186, 2002.
- 2. Lago G., Lauzan E., Coto G.,** “Characterization of an extract obtained from human umbilical cord” *CENIC* 33(1) 24-30, 2002.
- 3. Lago G, Lauzan E., Coto G.,** “Empleo de residuales de cordón umbilical humano para el aislamiento de polisacáridos de interés en la industria farmacéutica y cosmética”. *Revista Cubana de Farmacia* 36(3) 230-238, 2002.
- 4. Lago G.,Lauzan E., Coto G., Flores MI.** “Sal sódica de ácido hialurónico”. Registro Sanitario No 088/ 01-1X, 2001.
- 5. Lago G., Lauzan E., Coto G.,** “Aprovechamiento de los residuales de cordón umbilical humano como fuente de obtención de heteropolisacáridos”. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 24(3) 13–18, 2003.
- 6. Lago G., Oruña L., Cremata J.A., Coto G.,** “ Isolation of Hyaluronic Acid from human umbilical cord residual used as wound healing in rats”. *J. Pharm. Pharmaceut Sci* 7(2) 92-185, 2004.

7. **Lago G., Oruña L., Cremata J.A., Coto G., Pérez C., Lauzan E., Kennedy J.F.**, "Isolation, purification and characterization of Hyaluronan from human umbilical cord residues". *Carbohydrate Polymers* 62 (4) 321-326, 2005
8. **Lauzan E., Lago G.**, " Caracterización y aprovechamiento de los residuos etanolicos procedentes de la obtención de ácido hialurónico a partir de cordón umbilical ".*Revista Cubana de Farmacia* 38 (1) 252-256,2004 .
9. **Miyares C., Coto G., Lago G.** "Loción para después de afeitarse". Registro Sanitario No Licencia Sanitaria R 051/00-IV, 2000.
- 10.**Oruña L.,Coto G., Lago G., Dorta D.**, "Efecto del ácido hialurónico en la cicatrización de heridas". *Revista CENIC* 34 (2) 73–78, 2003.
11. **Oruña L, Coto G., Lago G.**, "Wound healing activity of hyaluronic acid from human umbilical cord". *Journal of Pharm Pharmaceut Science.* 6(2)101-188,2003.
12. **Oruña L., Lago G., Coto G.**, " Molecular and tissue mechanism of hyaluronic acid in the wound healing". *J. Pharm Pharmaceut Sci* 7(2) 92-185, 2004.

Trabajos presentados en eventos

1. **Lago G.,Oruña L.,Coto G.**, " Obtención de glucosaminoglicanos a partir de cordones umbilicales ". *BIOTECNOLOGIA HABANA* 97.Centro de Ingeniería genética y Biotecnología, (cartel) Cuba, 1997.
2. **Lago G.,Lauzan E., Coto G.**, " Empleo de residuales de cordón umbilical humano en el aislamiento de polisacáridos de interés en la industria farmacéutico y cosmética" . *CUBAFARMACIA* 2002, VIII Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas y V Encuentro

Iberoamericano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias.,
Palacio de Convenciones,8 (Cartel) Cuba 2002.

3. **Lago G., Oruña L., Coto G.**,“ Isolation of Hyaluronic Acid from human umbilical cord residual used as wound healing in rats”. CSPS 7th Annual Symposium on Pharmaceutical Science Vancouver 8-12 Jun Canada, 2004 (cartel).
4. **Lauzan E., Lago G.**,“Caracterización y aprovechamiento de los residuos etanólicos procedentes de la obtención de ácido hialurónico a partir de cordón umbilical”. Encuentro Iberoamericano sobre las ciencias farmacéuticas y alimentarias, Cuba, 2000 (presentación oral)
5. **Lauzan E. Lago G.**, "Caracterización de un extracto rico en ácido hialurónico". Congreso Joven Ciencia, Cuba 2001 (presentación oral).
6. **Oruña L.,Coto G.,Lago G.**,“ Efecto del ácido hialurónico en la cicatrización de heridas abiertas”. (presentación oral) Convención de Ciencias Médicas Básicas Girón, Cuba, 2002.
7. **Oruña L., Coto G., Lago G.**,“ Wound healing activity of hyaluronic acid from umbilical cord”. CSPS 6th Annual Symposium on Pharmaceutical Sciences ,Montreal, (cartel) Quebec ,2003.
8. **Oruña L. Lago G.,Coto G.**, “ Molecular and tissue mechanism of hyaluronic acid in the wound healing”. CSPS 7th Annual Symposium on Pharmaceutical Science Vancouver 8-12 June Canada, 2004 (cartel).
9. **Oruña L.,Coto G., Lago G.**,“ Evaluación morfométrica e histopatológica de una jalea cicatrizante empleando un crudo de ácido hialurónico al 4%”.IV Encuentro Iberoamericano sobre las ciencias farmacéuticas y alimentarias, Cuba, 2000 (cartel).

- 10. Lago G., Coto G. Lauzan E.**, “Aislamiento, purificación y caracterización de ácido hialurónico a partir de cordón umbilical humano”. XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica (presentación oral).
- 11. Lago G.** “Aplicaciones generales del ácido hialurónico sal sódica obtenido a partir de cordón umbilical humano. Perspectivas futuras”. II Seminario Internacional de Histoterapia Placentaria. Cuba, 2006 (presentación oral).
- 13. Lago G., Oruña L., Coto G., Lauzan E., Cremata JA.**, “Estabilidad del ácido hialurónico semirrefinado aislado de cordón umbilical residual”. 14th International Scientific Congress CNIC, 2005 (Presentación oral).
- 14 . Oruña L., Lago G., Coto G.** “Efecto del ácido hialurónico en la cicatrización de heridas en ratas”. VI Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica, Celebrado en internet [http:// conganat.sld .cu/6CVHAP /](http://conganat.sld.cu/6CVHAP/), Junio del 2004.
- 15.Oruña L, Lago G,Coto G.,Barzaga G.,Agüero .** “Ensayo farmacológico de tres niveles de dosis de un gel de ácido hialurónico. Evaluación farmacológica en el proceso de cicatrización de heridas de tres niveles de dosis de un gel de AH ”. II Seminario Internacional de Histoterapia Placentaria. Cuba, 2006 (presentación oral).

Participación en el Forum

Dos trabajos presentados en el XIII Forum de Base uno de ellos evaluado como destacado y una mención.

- Aprovechamiento de los residuales de cordón umbilical humano como fuente de obtención de heteropolisacáridos con fines terapéuticos y cosméticos. (Trabajo Destacado).

- Caracterización de un extracto que contiene ácido hialurónico. (Mención)

Dos trabajos presentados en el XIV Forum de Base uno relevante y uno destacado que son:

- Aislamiento, purificación y caracterización de ácido hialurónico a partir de cordón umbilical humano. Este trabajo se presentó en el XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica con categoría de mención.

- Presentación del registro sanitario del ácido hialurónico. Materia prima.

(Trabajo Destacado)

Tutoría de Tesis

Dos Trabajos de Diploma de Licenciatura en Farmacia un trabajo de curso para graduado de Técnico Medio.

Colaboración en un tema de Maestría relacionado con la aplicación del producto como cicatrizante en heridas abiertas.

Registros Otorgados

- Ácido Hialurónico. Registro Sanitario otorgado por el Instituto de Higiene de los Alimentos. Registro Sanitario No 088/ 01-1X.

- Loción para después de afeitar base ácido hialurónico. Registro Sanitario R 051/00-IV, otorgado por el Instituto de Higiene de los Alimentos.

VII. REFERENCIAS.

VII. REFERENCIAS

- 1. Agreen U.M., Tammi R.H., Tammi M.I.**, “Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture”. *Free Radic Biol Med.* 23(7) 996-1001, 1997.
- 2. Alam C.A., Seed M.P., Willogby D.A.**, “Angiostasis and vascular regression in chronic granulomatous inflammation induced by Diclofenac in combination with hyaluronan in mice”. *J Pharm Pharmacol.* 47 (5) 407- 411, 1995.
- 3. Alguere P.**, “Intravitreal implantation of a high molecular weight hyaluronic acid in surgery for retinal detachment”. *Acta Ophthalmologica* 49(4) 975-978, 1971.
- 4. Angeloni S., Ridet J.L., Kusy N., Gao H., Grevaisen F., Guinchard S., Kohhar S., Sigrit H., Sprenger N.** “Glycoprofiling with micro-array of glycoconjugates and lectins”. *Glycobiology* 15 (1) 31-41, 2005.
- 5. Aono R.**, “The poly- α - and - β -glucuronic acid moiety of teichuronopeptide from the cell wall of the alkalophilic *Bacillus* strain C-125 ” *Biochem J.* 270 (2), 362-367, 1990.
- 6. Armstrong D.C., Johns M.R.**, “Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2759-2764, 1997.

7. **Balazs E.A.**, "Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof". US Pat. 4141973, 1979.
8. **Balazs E.A.**, "Hyaluronate based compositions and formulations containing same" US Pat. 4303676, 1981.
9. **Balazs E.A.**, "Sodium hyaluronate and viscosurgery", In Miller D ,Stegman R (eds): Healon (sodium hyaluronate) A guide to Its Use in Ophthalmic Surgery. John Wiley and Sons 5-28,1983.
10. **Balazs E.A.,Band P.**, "Hyaluronic acid: Its structure and use". Cosmetics and Toiletries 99(66) 65-72, 1984.
11. **Balazs E.A., Bland P.A., Denlinger J.L., Goldman A.T., Larsen N.E., Leshchiner E.A.**, " Matrix engineering ". Blood Coagulation Fibrinolysis 2(1) 173-180,1991.
12. **Baldacci M.**, "Pharmaceutical compositions of the topical use that contains hyaluronic acid and bacillus of Doberlein for the prevention and treatment of vaginal illnesses." IT 19951016952117, 1998.
13. **Barbucci R.**, "Inmobilization of sulphated hyaluronan for improved biocompatibility" .Journal of inorganic biochemistry 79 (1-4) 119-125, 2000.
14. **Barry F.**, "Proteoglycans. Structure and function".Trans Biochem Soc.18(2) 197-198, 1990.
15. **Beaty N.B., Terw W.P., Mello R. J.**, "Relative molecular weight and concentration determination of sodium hyaluronate solution by gel exclusion high performance liquid chromatography". Anal. Biochem. 147(2) 387-395, 1985.

16. **Bertheim V., Helltrom S.**, The distribution of hyaluronan in human skin and mature hypertrophic and keloid scar". *British J Plast. Surgery* 47(7) 483-489, 1994.
17. **Bery P., Olsson O.**, "Intra-articular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) for osteoarthritis of the hips a pilot study". *Clin. Exp. Rheumatol.* 22(3) 300-306, 2004.
18. **Blanco E.C.**, "Método analítico para la determinación de la capacidad fecundante de una muestra de semen humano". P 9200700, 1994.
19. **Blass S.L., Pure E., Hunter C.A.**, "A role of CD 44 in the production of IFN-gamma and immunopathology during infection with *Toxoplasma gondii*". *J. Immunol.* 166 (9) 5726-5732, 2001.
20. **Borer P.N.**, "Spectrophotometric quantitation of nucleic acid " *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edition In G.D. Fasman,ed. CRC Press, Cleveland,OH, 589, 1975.
21. **Botella J., Núñez C., Fernández E. M.,Gómez C.E., Fernández F.G., Gutiérrez J. F., Pérez F., Puerta F. J., Sanz J., Fernández-Tresguerres J. A.**, "El hígado transitorio. La placenta como órgano metabólico y de depósito", En *La Placenta. Fisiología y Patología*. Diaz de Santos (Ed) 135-136, 1986.
22. **Bradford M.M.**, "A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.* 72(2) 248-254, 1976.

- 23. Brismar K.**, "Cell proliferation matrix and use thereof". Pat no.5432167 Issue Data 1995 07 11, Appl 066165, 1995.
- 24. Brund K.D.**, "Intrarticular injections like treatment for the osteoarthritis of the knee." *Arthritis and Rheumatism* 43(6) 1192-1203, 2000.
- 25. Brun P., De-Galateo A., Camporese C.R., Abatangelo G.**, "Analysis of hyaluronic acid in sinovial fluids by reversed phase liquid chromatography". *J. Chromatogr. Biomed. Applic.* 526 (2) 530-534, 1990.
- 26. Callegaro L., Romeo A.**, "Method of using low molecular weight hyaluronic acid for stimulating bone formation". Pat no.5646129, 1997.
- 27. Callegaro L., Renier D.**, "Process for preparing a Hyaluronic Acid fraction having a low polydispersion index". PN 6020484, 2000.
- 28. Cantor J.O.**, "Hyaluronic acid effect for the prevention of lung emphysema" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225 (1) 65-71, 2000.
- 29. Carney S.L.** Proteoglycans. In Chaplin M.F. & Kennedy J.F. (eds.) *Carbohydrate analysis: A practical approach* IRL Press Washington DC, 134-135, 1986.
- 30. Casero R.**, "Methods of treating dermatological conditions". It Pat 5340579, 1994.
- 31. Casione M.** "Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone". *Biomaterials.* 16 (5) 569-575, 1995.
- 32. Catalogo AppliChem**, "Catalogo AppliChem" , D-64291, Darmstadt, Alemania 116, 2003.

- 33. Catalogo Fluka**, "Catalogo Fluka.". Fluka Chemie AG CH-9471 WA 10 633, 2003.
- 34. Catalogo Lab Depot**, "Catalogo Lab Depot". Lab Depot Chemie 120, 2005.
- 35. Catálogo SIGMA**, "Catálogo Sigma", Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Chemicals Company St.Louis, M063178. USA 540, 1994.
- 36.CECMED**, "Recolección, almacenaje y transportación de placentas humanas".CECMED Reg. 2/95, 1995.
- 37.CECMED**,"Requerimientos de los Estudios de Estabilidad para el Registro de Ingredientes Farmacéuticos Activos". CECMED Reg. 2000.
- 38.Chenevier G.C., Morin R.S., Lewarechal H., Poirandean S.**,"Effects of pro-and antiinflammatory cytokines and nitric oxide donors on hyaluronic acid synthesis by synovials cells from patients with rheumatoid arthritis" . Clin.Sci. 107(3) 291-306, 2004.
- 39.CIDEM**, "Caracterización del cordón umbilical residual". Informe temático del CIDEM. 1998
- 40.Colin J., Durand L., Mouillon M., Lagoutte F.**, "Comparative clinical trial of AMO Vitrax and Healon use in extracapsular cataract extraction". J. Cataract Refract Surg. 21(2) 196-201, 1995.
- 41.Coutts R.D., Waddell D.D.**, "Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee". Orthopedic 27(5) 470 -471, 2004.
- 42.Coward R.T.**, "Hyaluronic acid for the detection, localization and diagnosis of tumors" .OEE9592876, 2000.

- 43. Cowman M. K., Hittner D. M., Davis J.,** “¹³C-NMR Studies of Hyaluronan: Conformational Sensitivity to Varied Environments”. *Macromolecules* 29(8) 2894-2902, 1996.
- 44. Danishevsky I., Bella Jr.,** “The sulphated mucopolisaccharides from human umbilical cord”. *J of Biological Chem.* 247(1) 147-150, 1966.
- 45. DellaValle F., Romeo A., Lorenzi S.,** “Salts and mixture of Hyaluronic Acid with pharmaceutically active substances, pharmaceutical compositions containing the same and methods for administration of such compositions”. Pat.No. 5442053, 1995.
- 46. Delpech B., Bertrand P., Maingonnat C.,**“Immunoenzymoassay of the hyaluronic acid-hyaluronectin interaction: application to the detection of hyaluronic acid in serum of normal subjects and cancer patients”. *Anal Biochem* 149 (4) 555-565,1985.
- 47. Devaraj N., Devaraj H., Bhavanandan V. P.,** “Purification of mucin glycoprotein by density gradient centrifugation in caesium trifluoroacetate”. *Anal Biochem.* 206(1) 142-146, 1992.
- 48. Díaz I., Juárez M.,** “Determinación colorimétrica de azúcares reductores en jugo mezclado, miel final y azúcar crudo”. *Revista ATAC,* 3 22-25, 1977.
- 49. Dolzhenko M.I., Lepekhin E.A., Berezin V.A.,** “A novel method for evaluation of carbohydrate binding activity, enzyme-linked-carbohydrate-binding-assay (ALCBA)”. *Biochem .Mol. Biol. Int.* 34(2) 261-271,1994.
- 50. Falk R., Asenlai S., Klein E.,** “ Hyaluronic acid use to repair the reperfusion damages for isquemia.” *CA* 19920220922061567, 1994.

- 51. Fedarko N.S., Termine J.D., Robey P.G.**, "High-performance-liquid chromatographic separations of hyaluronic acid and proteoglycans produced by human bone cell cultures". *Anal Biochem.* 188 (2) 398-407, 1990.
- 52. Gao F., Cao M.L., Wang L.**, "Brain hyaluronan binding protein inhibits tumor growth". *Chin Med J.* 117(7) 1072-1078, 2004.
- 53. Garner R.J., Papworth D.S.** "Antisépticos, desinfectantes y detergentes". En, Clarke E.G.C. y Clarke M. (eds). *Toxicología veterinaria*. Editorial Pueblo y Educación, 161-162, 1977.
- 54. Gencat**, "Ley No 10 sobre residuos". *Boletín europeo* No 96, 1998
- 55. Glenn D.P.**, "Biomaterials from chemically-modified Hyaluronan". *GlycoScience* 3 (1) 10-26, 2002.
- 56. Golberg R.L.**, "Method for measuring hyaluronic acid". *US Pat.* 5378637, 1995.
- 57. Golberg E.**, "Method and compositions for preventing surgical adhesion and tissue damage". *PN* 6010692, 2000.
- 58. Gómez J.A., Amankwah R., Powell-Richards A., Dua H.S.**, "Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro". *Br J Ophtalmol.* 88(6) 821-825, 2004.
- 59. Göran K, Rolf B.**, "Determination of the distribution of molecular masses of sodium hyaluronate by high-performance anion exchange chromatography". *J Chromatogr. A* 986 (1) 67-72, 2003.

- 60. Grimshaw J., Trocha JK, Fisher W., Rice A., Smith S., Speeing P., Duffy J., Mollan R.,** “Quantitative analysis of hyaluronan in human synovial fluid using capillary electrophoresis” . *Electrophoresis* . 17(2) 396-400, 1996.
- 61. Hagel L., Luwstrom H., Anderson T., Lindblom H.** “Properties in theory and practice of novel gel filtration lab. Packs for standard liquid chromatography”. *J Chromatogr.* 476 (3) 329-344, 1989.
- 62. Hascall V.C.,** “Hyaluronan, a common thread”. *Glycoconjugate Journal* 17 (7-9), 607-16, 2000.
- 63. Hascall V.C., Majors A.K., De la Motte C.A., Evanko S.P., Wang A., Drazk J.A. ,** “Intracelular hyaluronan a new frontier for inflammation? ”. *Biochim Biophys Acta* 1673 (1-2) 3-12, 2004.
- 64. Hayase S., Oda Y., Honda S., Kakeki K.,** “High performance capillary electrophoresis of hyaluronic acid. Determination of its amount and molecular mass”. *J. of Chromatogr. A* 768(2) 295-305, 1997.
- 65. Heatley F., Scott J.E.,** “A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan ”. *Biochem J* Sept 1 254 (2) 489-493, 1988.
- 66. Hildesheim J.,** “Non inflammatory fraction of the hyaluronic acid and procedure to prepare it.” US 1986032186842634, C08 B 37/08, A 61 L 31/00, 1983.
- 67. Hollands I., Pimienta R., Miyares C.** “Demostración de la acción bronceadora del fotoprotector epidérmico en el Centro de Histoterapia Placentaria ”. XIV Forum de Base de Ciencia y Técnica, 2003.

- 68. Holbeck S.M., Petillo P.A.**, “The solution conformation of hyaluronan a combined NMR and molecular dynamics study”. *Biochemistry* 33(47) 14246-14255, 1994.
- 69. Homandberg G.A., Hui-F., Wen C., Kuettner A., William J.M.**, “Hyaluronic acid suppresses fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: I. In vitro” . *Osteoarthritis Cartilage* 5(5) 309-319, 1997.
- 70. ICH**, “Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological Products”. Recommended for Adoption at Step 4 of the ICH Process on November 1995 by the ICH Steering Committee, 1995.
- 71. Inmunoensayos**, “Para la detección del antígeno de superficie de la hepatitis B en suero humano”. UMELISA HBC AG Centro de Inmunoensayos, Oct. de 1994.
- 72. Inmunoensayos (a)**, “Para la detección de anticuerpos al virus de la hepatitis C.” UMELISA HCV. Centro de Inmunoensayos, Abril de 1999.
- 73. Inmunoensayos (b)**, “Para la detección de anticuerpos al HIV-1 y HIV-2 ”. Centro de Inmunoensayos, UMELISA HIV 1+2, Abril de 1999.
- 74. Itokasu M., Matsunaga T.**, “ Clinical evaluation of sodium hyaluronate fir the treatment of patients with periartthritis of the shoulder”. *Clin. Ther* 17 (5) 946-955, 1995.
- 75. Jay G.D.**, “Current thinking on viscosupplementation in osteoarthritis”. *Med. Health. RI* 87(7) 213-215, 2004.

- 76. Jeanloz R.W.**, "Mucopolisaccharides of higher animals in carbohydrates". In Chemistry Biochemistry Vol II by Pigman W.W. (ed) New York Academic Press 12 598,1970.
- 77. Jourdan N.**, "A specific method for the determination of hyaluronate". Anal. Biochemistry 20 (5) 474-480, 1979.
- 78. Kainulanen V., Wang H., Schich C., Bernfield M.**, "Heparan sulphate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound healing fluid". Journal of Biological Chemistry 273 (19) 11563-11569, 1998.
- 79. Karen M.L., Ellington M.B.**, "Thermal stability of sodium hyaluronate in aqueous solution". Journal of Medical Materials Research. 28(10) 1239-1244, 1994.
- 80. Karvinen S., Pasonen-Seppanen S., Hyttinen J.M., Pienimaki J.P.**, "Keratinocytes growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocytes hyaluronan synthases 2 and 3". J.Biol.Chem. 278(49) 495-504, 2003.
- 81. Kelly M.A., Moskowitz R.W., Lieberman J.R.**, "Hyaluronan therapy: Looking toward the future". Am. J. Orthop.33 (2) 23-28, 2004.
- 82. Kennedy J. F.** "Procedimiento para la clarificación de solución de sal sódica de ácido hialurónico". Chembiotech Laboratories, University of Birmingham Research Park, Vincent Drive, Birmingham B152SQ, UK. Comunicación personal, 2005

- 83. Kennedy J.F.** “Contenido de ácido hialurónico en el cordón umbilical humano”.
Chembiotech Laboratories, University of Birmingham Research Park, Vincent Drive, Birmingham B152SQ, UK. Comunicación personal, 2006.
- 84. Khademkosslim A., Suhky, Yang J.M., Yeh J., Levenberg S. , Langer R.,**
“Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and Poly-L-Lysine for patterned cell co-cultures”. *Biomaterials* 25(17) 3583-3592, 2004.
- 85. Korn E.D.,** “The isolation of heparine from mouse mast cell tumor”. *J. Cell.* 234 (6) 1325-1329, 1959.
- 86. Kutsch H., Schleich C.,** “Improve colorimetric determination of high molecular weight hyaluronic acid from synovial fluids”. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 333(9) 810-820, 1989.
- 87. Kvan C., Granese D., Flaibani A., Zanetti F., Paoletti S.,** “Purification and characterization of hyaluronan from synovial fluid”. *Anal. Biochem.* 211(1) 44-49, 1993.
- 88. Ladisla R.** “Cellular and molecular mechanism of aging and age related disease”. *Pathology oncology research* 6 (1) 1-7, 2000.
- 89. Lago G., Coto G., Oruña L.,** Aislamiento de polisacáridos a partir de cordones umbilicales humanos”. *Revista Cubana de Farmacia* 36(3) 182-6, 2002.
- 90. Lago G., Coto G., Lauzan E.,** “Aislamiento, purificación y caracterización del ácido hialurónico a partir de cordones umbilicales”. *XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica*, 2003.

- 91. Lago G., Oruña L., Cremata J.A., Coto G., Pérez C., Lauzan E., Kennedy J.F.**, “Isolation, purification and characterization of Hyaluronan from human umbilical cord residues”. *Carbohydrate Polymers* 62 (4) 321-326, 2005
- 92. Lazenby G.W., Brooker G.**, “The use of sodium hyaluronate in intracapsular cataract extraction with insertion of anterior chamber intraocular lenses”. *Ophtal Dirg.* 12 (5) 646-649, 1981.
- 93. Lesley J., Hyman R., English N., Cattterall J.B., Turner G.A.**, “CD 44 in inflammation and metastasis”. *Glycoconj. J.* 14(5) 611-622, 1997.
- 94. Lima A., Cavalcanti R., Aldo da Cunhay M.**, “ The topic effect of hyaluronic acid on the healing of cornea an experimental study in rats”. *Rev. Bros. Oftalmol.* 58 (12) 933-937, 1999.
- 95. Liu D., Sy M.S.**, “Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD 44 involving a cysteine in the transmembrane domain”. *J.Immunol.* 159(6) 2702-2711, 1997.
- 96. Lym H.S., Suh Y., Park C.K.**, “Effect of hyaluronic acid on the polymorphonuclear leukocyte (PMN) release of active oxygen and protection of bovine corneal endothelial cells from activated PMNs” . *Korean J. Ophthalmol* 18(1) 23-28, 2004.
- 97. Mahoney D.J., Aplin R.T., Calabro A., Hascall V.C.**, “Novel methods for the preparation and characterization of hyaluronan oligosaccharide defined length”. *Glycobiology* 11(12) 1025-1033, 2001.

- 98. Maccari F., Volpi N.,** "Glycosaminoglycans blotting on nitrocellulose membranes treated with cetylpyridinium chloride after agarose electrophoretic separation". *Electrophoresis* 23(19) 3270-3272, 2002.
- 99. Macnugth P.T.,** "Artificial tears." NSOE 91904702, 2001.
- 100. Marshall K.W., Manopoulos V., Manar K., Staples J., Damyanovich A.,** "Amelioration of disease severity in intrarticular hyaluronan therapy in bilateral amine osteoarthritis". *Journal of orthopedic research* 18(3) 416-485, 2000.
- 101. Martin F.C.** "Monosaccharides". In Chaplin M.F. & Kennedy J.F. (Eds) *Carbohydrate analysis: A practical approach* IRL Press Washington DC, 9-28, 1986.
- 102. Maytin E.V., Chung H.H., Seetharaman V.M.,** "Hyaluronan participates in the epidermal response to disruption of the permeability barrier in vivo". *Am.J.Pathol.* 165(4) 1331-1341, 2004.
- 103. Melgares P.,** "Especificaciones de calidad". *Laboratorios Control Químico. Análisis y especificaciones de calidad de productos placentarios. Centro de Histoterapia Placentaria* 15, 1998.
- 104. Mergulin D., Fourtanie A., Theve T., Medaisk C., Baeta M.,** "Alterations of proteoglycans in ultraviolet irradiated skin". *Photochem. Photobiol* 58(2) 211-218, 1993.
- 105. Mikelsaar R.H., Scott J.E.,** "Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan compared with electron microscopy and NMR data". *Glyconj. J.* 11 (2) 65-71, 1994.

- 106. Miles Lab. Inc.**, "Procedure to prepare hyaluronic acid." N.Sol. P0537938, N. Pub. 8603578, C08B 37/00, 1986.
- 107. Min H., Cowman M.K.**, "Combined Alcian Blue and silver staining at GAGs in polyacrilamide gels. Application to electrophoretic analysis of MW distribution". Anal. Biochem. 155(2) 275-285, 1986.
- 108 Miyares C.** "Jabón biactivante dérmico con Ácido Hialurónico". Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Registro Sanitario No. 060/02-XIV, 2002
- 109. Miyares E., Larrondo R.J., Coto G., Álvarez M.** "Evaluación de productos derivados del Ácido Hialurónico con acción antiacné". Libro Resumen XVI Forum de Ciencia y Técnica. Investigaciones y servicios clínicos. Centro de Histoterapia Placentaria, Julio 3-4, 2006.
- 110. Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Strecker G.**, Glycoproteins. In Chaplin M.F. and Kennedy J.F. (eds) Carbohydrate Analysis a practical approach. Washington DC: IRL Press. 175, 1986.
- 111. Motohashi N., Mori I.**, "Molecular weight determination of hyaluronic acid and its separation from mouse skin extract by high performance gel permeation chromatography using a precision differential refractometer". J. Chromatography 299 (4) 508-515, 1988.
- 112. Muir H., Hardigan L.**, "Structure of proteoglycans in Biochemistry series one": In Biochemistry of Carbohydrates by Whelan W. (Ed); London Butterworths 153, 1975.

- 113. Murray M.G., Thompson.,** “Rapid isolation of high molecular weight plant DNA” . Nucleic acid Res. 8 (6) 4321-4325, 1980.
- 114. Nagorski C., Opalensky D., Bettelheim F.A.,** “A study of collagen-hyaluronan interaction through swelling in polyacrylamide gels”. Res. Commun Mol. Pathol. Pharmacol 89 (1) 179-185, 1995.
- 115. Nakamura M., Nishida T.,** “Interaction of hyaluronan with fibronectin system in epithelial wound healing”. Connect Tissue 26(3) 227-235, 1994.
- 116. Nakamura M., Nishida T.,** “Recent development in the use of hyaluronan in wound healing”. Expert Opinion of Investigational. Drugs 4(3) 175-188, 1995.
- 117. Nakano T., Nakano K., Sim J.S.,** “A rapid simple method to estimate hyaluronic acid concentration in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis”. J. Agric. Food Chem 42 (2) 2766-2780, 1994.
- 118. NC.** “Mediciones de pH. Reglas generales para efectuar mediciones de pH”. Aseguramiento metrológico, NC 90-13 13; 17, 2000.
- 119. Nebinger P.,** “Comparison of gel permeation chromatography and ion exchange chromatographic procedures for separation of hyaluronic acid oligosaccharides”. J.Chromatography 320 (2) 351-359, 1985.
- 120. Neidhart M., Gay RE. , Gay S.,** “Anti-interleukin 1 and anti-CD-44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts”. Arthritis and Rheumatism 43(8) 1719-1728, 2000.

- 121. Oba S.M., Berto A.G.A., Porseratti C.C., Barbosa C.D., Sampaio L.O.**, "Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker 256 rat mammarally carcinoma". *Bra.J.Med.Res.* 36(8) 1079-1089, 2003.
- 122. Oksala Q., Sala T., Tammi R., Hakkinen L., Jalkanen M., Inki P.**, "Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing". *J. Histochem. Cytochem.* 43(2) 125-135, 1995.
- 123. Oruña L., Coto G., Lago G. (a)** , "Wound healing activity of hyaluronic acid from human umbilical cord". *Journal of Pharm Pharmaceut Science* 6(2)101-188, 2003.
- 124. Oruña L., Coto G., Lago G. (b)**, "Efecto del ácido hialurónico en la cicatrización de heridas". *Revista CENIC* 34 (2) 73-78, 2003.
- 125. Oruña L., Lago G., Coto G., Barzaga P., Agüero S.** "Ensayo farmacológico de tres niveles de dosis de un gel de ácido hialurónico. Evaluación farmacológica en el proceso de cicatrización de heridas de tres niveles de dosis de un gel de AH". *II Seminario Internacional de Histoterapia Placentaria.* Cuba, 2006.
- 126. Orvisky E., Soltes L., Chabreck P., Navak I., Kery V., Stancikova M., Vius I.**, "Determination of hyaluronan weight distribution by means of high performance chromatography ". *J of Liquid Chromatogr.* 15(18) 3203-3218, 1992.
- 127. Pape L.G.** "Intracapsular and extracapsular techniques of lens implantation with sodium hyaluronate". *Am. Intraocular Implant Soc. J.* 6 (2) 342-343, 1980.

- 128. Park M.G. ,Jang J.P. ,Kang W.K.,** “Mutant race of Streptococcus Zooepidemicus, to prepare hyaluronic acid.” PT AK 12993042169306423, 1998.
- 129. Pazur J.H.** “Neutral polysaccharides ”.In Chaplin M.F.and Kennedy J.F.(eds) Carbohydrate Analysis a practical approach. Washington DC: IRL Press. 63-64, 1986.
- 130. Polack F.M., Demang T., Santaella H.,**“Sodium Hyaluronate in keratoplasty and IOL implantation” . Ophthalmol 88 (4) 425-429, 1981.
- 131. Polack F.M.,**“Penetrating keratoplasty using MK-stored corneas and Na-hyaluronate ”. Cornea 1 (1) 105-113, 1982.
- 132. Poli S.,Bocchiala G., Casanto E.,**“ Proceso para la preparación de ácido hialurónico mediante fermentación con Streptococcus”. IT 199407269415, C12 P19/26, 1998.
- 133. Ponting J.M., Kumar S.,**“Isolation and characterization of hyaluronan binding protein hyaluronectin, from human placenta and its localization with hyaluronan”. J Anat 186 (1) 131-142, 1995.
- 134. Pruett R.C., Schepeus C.L., Swam L,** “Hyaluronic acid vitreous substitute”. Arch. Ophthalmol. 97 (6) 2325-2330, 1979.
- 135. Quiñones M.,** “Incidencia de úlceras venosas en la población cubana”. Subdirectora de investigaciones del Instituto de Angiología y Cirugía Vascular. Comunicación personal, 2006

- 136. Raioa L., Hezzi F., Cromi A., Cereda E., Passi, A.,** “Sonographic morphology and hyaluronan content of umbilical cords of healthy and down syndrome fetuses in early gestation.” *Early Human Development* 7(1),1-12, 2004.
- 137. Raioa, L., Cromi, A., Ghezzi, F., Passi, A., Karousou, E., Viola, M., Vigetti, D., De Luca, G., Bolis, P.,** “Hyaluronan content of Wharton’s jelly in healthy and Down syndrome fetuses”. *Matrix Biology* 24 (1), 166 – 174. 2005.
- 138. Rehakova M., Bakos D., Soldan M., Vizarova K.,** “Depolymerization reactions of hyaluronan in solution”. *Int J Biol Macromol.* 16 (3) 121-124, 1994.
- 139. Rosier R.N., O’ Keefe R.J.,** “Hyaluronic acid therapy”. *Instructional course lectures* 49 (3) 495-502, 2000.
- 140. Saito T., Hayamizu, Yanagisawa M., Yamamoto O.,** “N-acetil glucosamine”. *Spectral Database for Organic Compounds* No 4624, 1987.
- 141. Saltik-Temizel N., Kogak N., Qzen H., Demir H.,** “Serum hyaluronic acid concentrations in children with cirrhosis”. *Indian J. Gastroenterol* 23(4) 129-130, 2004.
- 142. Santocano M., Ceccarini C.,** “ Uso del ácido hialurónico como lubricante de prótesis oculares” . *IT* 19920120920039; A61L27/00, A61L31/73, 1994.
- 143. Savani R.C., Cao G., Puoler P.M., Zaman HA., Zhan Z., Delisse H.M.,** “Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptor for HA mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis” . *J. Biol.* 276(39) 37770-37778, 2001.

- 144. Schiller S.**, “A methods for the separation of acid mucopolisaccharides: Its applications to the isolation of heparin from skin of rats”. J. Biol. Chem. 4(2) 236-240, 1961.
- 145. Schubert H., Reulinger J.L., Balazs E.A.**, “Sodium hyaluronate injected into the anterior chamber of the owl monkey. Effect on IOP and rate of disappearance” . Abstract ARUO 1, 1981.
- 146.Scott J.E., Heatley F, Hull W.E.**, “Secondary structure of hyaluronate in solution. A ^1H nmr investigation at 300 and 500 MHz in [^2H 6] diethyl sulphoxide solution”. Biochem J. 220 (1) 197-200, 1984
- 147.Scott J.E., Heatley F.**, “Hyaluronic form specific stable tertiary structure in aqueous solution: A ^{13}C -NMR study”. Proc Natl Acad Sci. 96 (1) 4850-4855, 1999.
- 148. Shaji N., Shimizuk, Takahashi K., Nemoto R., Kawai H., Tomiake T.**, “The application of cross-linked hyaluronate hydrogel to trabeculectomie”. Nippon Ganka Gakkai Zasshi 108(5) 277-282, 2004.
- 149. Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H.**, “Hyaluron a receptors: Key players in growth, differentiation, migration and tumour progression”. Curr. Opin. Cell Biol. 6 (8) 726-730, 1994.
- 150.Shibata S., Yoneda S., Yanagishita M., Yamashita Y.**, “Isolation of proteoglycans (versicans) aggregate from rat dental pulp” . Archives of oral biology 45(7) 563-568, 2000.

- 151. Shiedlin A., Bigelow R., Christophes W., Arbaki S., Yank L., Macer R.V., Wainwright N., Childs A., Miller R.J.** "Evaluation of Hyaluronan from different sources:Streptococcus zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous and Human Umbilical Cord". *Biomacromolecules* 5(6) 2122-2127, 2004.
- 152.Sloper K.S., Brown R.S.,Baun J.D.,** "The water content of the human umbilical cord " *Early Hum. Dev.* 3(2) 205-210, 1979.
- 153. SOE,** "Administración oral de cantidades eficaces de formas de ácido hialurónico ; Tratamiento del cancer y prevención de la metastasis ". SOE 97900058 y 95917846, 2000.
- 154. Stacey M., Barker S.** *A Carbohydrate of Living Tissues*, In London : D.Van. Nostrand Co.,Ltd pgs 215 -217,1962.
- 155. St.Ang. H.L.,** "Method and means for the production of Hyaluronic Acid ". Pat.No. 6090596, 2000.
- 156. Stegmann R., Miller D.,** "The protective active of sodium hyaluronate in corneal transplantation". *Ocular Ther Surgery.* 2(1) 28-31, 1981.
- 157. Sunwoo H.H., Nakano T., Sim J.S.,** "Isolation and characterization of proteoglycans from growing antlers of wapiti". *Comparative Biochemistry Physiology Biochemistry B :Biochemistry and Molecular Biology.* 124 (4) 437-442, 1998.
- 158.Suzuki S.,Koide A.,** "Fractionation and isolation of heparan using poly-L-lysine sepharose ". *Anal. Biochem.*137 (1) 101-105, 1984.

- 159. Suzuki M, Ishigaki K.**, "Intrarticular preparation for the treatment of arthropathy". Pat No 6428804, 2002.
- 160. Tajima S., Yamada H.**, "Glycosaminoglicans in fibroblasts of Scleroderma from tissue". *Dermatology* 192(2) 400-401, 1995.
- 161. Takeda M., Terasawa H., Sakakura, Yamaguchi Y., Kajiwara M., Shimada I.**, "AH, 13C and 15N backbone resonance assignments of the hyaluronan binding domain of CD-44". *J Biomol NMR* 29(1) 97-98, 2004.
- 162. Tammi R., Saamanin A-M, Maibach H.I. Tammani M.**, "Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal Compartments of human skin in organ cultures". *J Invest Derm.* 97(1) 126-130, 1991.
- 163. Tanimoto K., Suzuki A., Ohno S., Honda K., Tanaka N.K., Ohno-Nakahara M., Nakatani Y., Ueki M., Tanne K.**, "Effects of TGF-beta on hyaluronan anabolism in fibroblasts derived from synovial membrane of the rabbit temporomandibular joint". *J Dent Res.* 83(1) 40-44, 2004.
- 164. Termeer C.C., Hennies J., Voith V., Ahren T., Weiss JM.**, "Oligosaccharides of hyaluronan are potent activation of dendritic cells". *Journal of Immunology* 165(4) 1863-1878, 2000.
- 165. Toffanin R., Kuan B.J., Flaibani A., Atson M., Biviano F., Paoletti S.**, "NMR studies of oligosaccharides derived from hyaluronate : complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR of aqueous and tetra-saccharides and comparison of chemical shifts for oligosaccharides of increasing degree of polymerisations". *Carbohydrate res.* 245(1) 113-128, 1993.

- 166. Toida T., Linhardt R.J.**, "Detection of glycosaminoglycans as a cooper (II) complex in capillary electrophoresis". *Electrophoresis* 17(2) 341-446, 1996.
- 167. Tsukamoto T., Yamamoto T., Ikeke T., Takemura S., Shuto T., Kubo S., Hirohashi K.**, " Serum markers of libbers fibrosis and histology severity of fibrosis in research liver". *Hepatogastroenterology* 51(5-7) 777-780, 2004.
- 168. Tufvesson E., Westergren T.G.**, "Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin1beta and tumour necrosis factor-alpha". *Journal of cellular biochemistry* 77(2) 298-309, 2000.
- 169. Tuyen T.N.**, "Reticulated acidic polysaccharides and their uses." Pat No 9600065, 1997.
- 170. USP XXV** ."Multiple tube method and alcohol determination". USP XXV, 1876 -1877; 1980, 2002.
- 171. Vercruyssen K.P., Lauwers A.R., Demeester J.M.**, "Kinetics investigation of the degradation of hyaluronan by hyaluronidase using gel permeation chromatography" . *J Chromatogr. B Biomed. Appl.* 656 (1)179-190, 1994.
- 172. Verge P.**, "Subcutaneous doses of HAS in chronic bronchitis." *Am. J. Respir. Cont. Care Med.* 153(1) 132-136, 1996.
- 173. Volpi N.**, "Electrophoresis separations of GaGs on nitrocellulose membrane". *Anal. Biochem.* 240(1) 114-118, 1996.

- 174. Wannarat Y. , Lisheng Z., Matthias M. , Masahiko Y., Daihei K., Hideto W. , Naoki I., Hisashi I., Koji K. ,** "Isolation and characterizations of the complex in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis" J. Biol Chem. 278 (35) 32710-32718, 2003
- 175. Weissman B., Meyer K.,** "The structure of hialobiuronic acid from umbilical cord" . J.Am.Chem.76 (6) 1753-1757,1954.
- 176. Weigel P.H., Frost S.J., Mc Gary C.T., LeBoeuf R.D.,** "The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing". Int.J. Tissue React. 10(6) 355-365,1988.
- 177. Wen D.Y.,** "Intrarticulars Injections for the osteoarthritis of the knee." American Family Physician 62(3) 565-570, 2000.
- 178.WHO,**"Requirements for Vi polisaccharide typhoid vaccines (Requirements for Biological Substances No. 48)" .WHO Tech. Rep. Series 840 14-33, 1994.
- 179. Wider, G., Wuthrich, K.** "A simple experimental scheme using pulsed- field gradients for coherence-pathway rejection and solvent suppression in phase-sensitive heteronuclear correlation spectra". J. Magn. Reson., Ser B, 102 (2), 239–241, 1993.
- 180. Wishart D., Bigam C.G. ,Yao J., Abilgaard F.,Dyson H.J., Oldfield E., Markle J.L.,Sykes B.D.** "¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR". J.Biomolec NMR,6 (1) 135-140, 1995.
- 181. Yamaguchi T.,** "Procedure for the production of hyaluronic of low molecular weight." N.Pub.2070335 C08B37/08, 1995.

- 182. Yokoboric A.T., Kawaharada T. Sasaki S., Watanabe S., Fang S.H., Komats. ,** “Mechanical test method on the estimation of the lubricant performance by hyaluronic acid”. *Biomed Mater Eng.* 5 (1) 117-124, 1995.
- 183. Young G.L.,Jewell D.,** “Creams for preventing stretch marks in pregnancy”. In,*The Cochrane Library* ,Issue 4 pg. 520 Oxford, 2004.
- 184. Zollner N., Krisch K.Z.,** “Lipids determination ”. *Ges, Exp.Med.* 135(1) 545-550 ,1962.

VIII. ANEXOS

Mod. 33-31
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
FARMACIA

UNIDAD:

Ctro. de Hist. Placentaria

**RESULTADO DE
CONTEO
MICROBIOLÓGICO
Y DIFERENCIAL**

ENTRAD

Inicio de Prueba:

11	11	98	11	11	98
Día	Mes	Año	Día	Mes	Año

PRODUCTO:

Crudo ácido hialurónico (21/9/98)

LOTE:

CONTROL:

CONTEO TOTAL DE BACTERIAS:

< 10 uol/RT

CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIACEAS:

-

CONTEO TOTAL DE HONGOS:

0

MICROORGANISMOS AISLADOS:

Bacilo GP, género: Bacillus.

Cumple

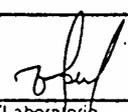
OBSERVACIONES:

APROBADO:

18	11	98
Día	Mes	Año

APROBADO

RESP. DE PRODUCTOS NO ESTERILES

ACM-10	CENTRO DE H. TERAPIA PLACENTARIA PLANTA	ENTRADA:			Incl. de Prueba:								
RESULTADO DE CONTEO MICROBIOLÓGICO Y DIFERENCIAL		22	1	01	23	1	01						
		Día	Mez	Año	Día	Mez	Año						
PRODUCTO: Acido Hialurónico													
LOTE 98001													
CONTEO TOTAL DE BACTERIAS: 40 UFC/gr													
CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIAS 0													
CONTEO TOTAL DE HONGOS 0													
MICROORGANISMOS AISLADOS: Bacilo GP, género: Bacillus Cumple.													
OBSERVACIONES: Dpto. de Investigación.													
Aprobado		 J. Laboratorio			<div style="border: 2px solid black; padding: 5px; display: inline-block; transform: rotate(-5deg);"> APROBADO </div>								
					<table border="1"> <tr> <td>30</td> <td>1</td> <td>01</td> </tr> <tr> <td>Día</td> <td>Mez</td> <td>Año</td> </tr> </table>			30	1	01	Día	Mez	Año
30	1	01											
Día	Mez	Año											

Mod. 33-31
MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
FARMACIA

UNIDAD:

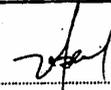
Unid. de Hist. Placentaria

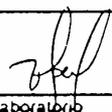
**RESULTADO DE
CONTEO
MICROBIOLÓGICO
Y DIFERENCIAL**

ENTRADA

Inicio de Prueba:

11	11	98	11	11	98
Día	Mes	Año	Día	Mes	Año

PRODUCTO: Crudo acido hialuronico (28/3/98)							
LOTE:	CONTROL:						
CONTEO TOTAL DE BACTERIAS: 230 col/gr							
CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIACEAS: -							
CONTEO TOTAL DE HONGOS: 0							
MICROORGANISMOS AISLADOS: Bacilo GP, género: Bacillus Cumple							
OBSERVACIONES:							
<table border="1"><tr><td>18</td><td>11</td><td>98</td></tr><tr><td>Día</td><td>Mes</td><td>Año</td></tr></table>	18	11	98	Día	Mes	Año	APROBADO:  APROBADO RESP. DE PRODUCTOS NO ESTERILES
18	11	98					
Día	Mes	Año					

AGENCIA	CENTRO DE INVESTIGACION PLACENTARIA PLANTA	ENTRADA:	Inicio de Prueba:							
RESULTADO DE CONTEO MICROBIOLÓGICO Y DIFERENCIAL		22	11	2013	23					
		Día	Mes	Año	Día	Mes	Año			
PRODUCTO: <i>Leche Infantil</i>										
LOTE:										
CONTEO TOTAL DE BACTERIAS:										
CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIAS: 0										
CONTEO TOTAL DE HONGOS: 0										
MICROORGANISMOS AISLADOS:										
<i>Bacillus</i> , género: <i>Bacillus</i>										
<i>Staphylococcus</i> .										
OBSERVACIONES: <i>Dpto. de Investigación</i>										
Aprobado:					APROBADO					
		J. Laboratorio						<table border="1"> <tr> <td data-bbox="1053 1041 1117 1097">Día</td> <td data-bbox="1117 1041 1165 1097">Mes</td> <td data-bbox="1165 1041 1236 1097">Año</td> </tr> </table>		
Día	Mes	Año								

Mod. 33-31
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
FARMACIA

UNIDAD:
Ctro. Hist. Placentaria

**RESULTADO DE
CONTEO
MICROBIOLÓGICO
Y DIFERENCIAL**

ENTRADA:

Inicio de Prueba:

18	1	99	19	1	99
Día	Mes	Año	Día	Mes	Año

PRODUCTO:

ácido hialurónico

LOTE:

99001

CONTROL:

CONTEO TOTAL DE BACTERIAS:

< 10 col/ml

CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIACEAS:

-

CONTEO TOTAL DE HONGOS:

50 col/ml

MICROORGANISMOS AISLADOS:

Bacilo GP, género: Bacillus
Cumple.

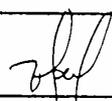
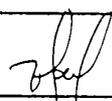
OBSERVACIONES:

26	1	99
Día	Mes	Año

APROBADO.

[Signature]
APROBADO

RESP. DE PRODUCTOS NO ESTERILES

CENTRO DE INVESTIGACIONES FLORENTINAS PLANTA		ENTRADA:			Inicio de Prueba:					
RESULTADO DE CONTEO MICROBIOLÓGICO Y DIFERENCIAL:		Día	Mes	Año	Día	Mes	Año			
PRODUCTO: Acido hialuronico										
LOTE: 89001										
CONTEO TOTAL DE BACTERIAS: 150 UFC/gr										
CONTEO TOTAL DE ENTEROBACTERIAS: 0										
CONTEO TOTAL DE HONGOS: 0										
MICROORGANISMOS AISLADOS: Bacilo sp, número: bacillus Sample.										
OBSERVACIONES: Dpto. Investigación.										
Aprobado:		 APROBADO			<table border="1"> <tr> <td>Día</td> <td>Mes</td> <td>Año</td> </tr> </table>			Día	Mes	Año
Día	Mes							Año		
 J. Laborador										



**INSTITUTO DE NUTRICION
E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**
Centro Colaborador de la OMS



Calzada de Infanta 1158, La Habana 10300, Cuba
Telefax (537) 708947, Tel (537) 794165, E-mail inha@intomec.cu

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE NUTRICIÓN E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS
DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE LA REPÚBLICA DE CUBA, EN USO
DE LAS FACULTADES QUE LE ESTAN CONFERIDAS:

CERTIFICA

Que el producto SAL SODICA DEL ACIDO HIALURONICO
Marca SIN MARCA, cuyo productor suministrador
es CENTRO DE HISTOTERAPIA PLACENTARIA
procedente de CIUDAD DE LA HABANA ha sido sometido a un
y evaluación del REGISTRO NACIONAL de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente
encontrándose el mismo APTO para el uso consumo humano y por lo tanto se aprueba
por periodo de 3 AÑOS a partir del día de hoy con la Licencia Sanitaria No 088-01-IX

Observaciones _____

CENTRO DE HISTOTERAPIA PLACENTARIA

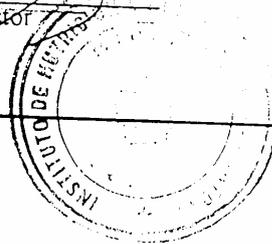
Dado en la Ciudad de La Habana, a los 07 días del mes de MAYO del 2007

Tomo IX

Folio 088

Dr

Director





**INSTITUTO DE NUTRICION
E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS**
Centro de Colaboración con la OMS



Calzada de Infanta 1158, La Habana 10300, Cuba
Telefax: (537) 708947, Tel: (537) 794165, E-mail: inha@infomed.sld.cu

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO DE NUTRICIÓN E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS
DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE LA REPÚBLICA DE CUBA, EN USO
DE LAS FACULTADES QUE LE ESTAN CONFERIDAS:

CERTIFICA

Que el producto LOCION PARA DESPUES DE AFEITAR
marca: DR. CARLOS MIYARES CAO, cuyo productor suministrador
es: CENTRO DE HISTOTERAPIA PLACENTARIA
procedente de: CIUDAD DE LA HABANA ha sido sometido a análisis
y evaluación del REGISTRO NACIONAL de acuerdo a lo establecido en la legislación vigente,
encontrándose el mismo APTO para el uso consumo humano y por lo tanto se aprueba y autoriza
por período de 3 AÑOS a partir del día de hoy con la Licencia Sanitaria No. R 051/00-IV

EL PROCESO DE RENOVACION DE CERTIFICADO SE INICIA CON 3 MESES DE
ANTELACION, POR LO QUE LA EMISION DEL MISMO SE HARA ANTES DE SU
FECHA DE VENCIMIENTO, MANTENIÉNDOSE LA LICENCIA SANITARIA DEL
CERTIFICADO ORIGINAL SOLAMENTE CON EL CAMBIO DE LA FECHA DE
EMISION, HASTA LA CUAL PERMANECERA VIGENTE EL CERTIFICADO
ANTERIOR.

Observaciones: _____

CENTRO DE HISTOTERAPIA PLACENTARIA

Dado en la Ciudad de La Habana, a los 14 días del mes JULIO del 2003

Tomo: IV

Folio: 051

Dr. _____

Director

