

Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización

Aniel Moya¹, Orfani Paz², Lázaro Joó¹, Elvira Gutiérrez³, Zoraida Rodríguez⁴, Armando Cádiz¹

1. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: amoya@finlay.edu.cu

2. Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba.

3. LABIOFAM. Ciudad de La Habana, Cuba.

4. Banco de Sangre de Marianao. Ciudad de La Habana, Cuba.

A partir de plasma humano se obtuvo albúmina mediante un método de termocoagulación selectiva. Se utilizaron diferentes combinaciones de caprilato de sodio y un tanto por ciento de etanol, lo cual permitió precipitar las globulinas manteniendo la albúmina en solución. En todas las pruebas se fijaron los parámetros siguientes: pH 6,9, temperatura 69 °C y tiempo de calentamiento 30 min. Los mejores resultados de concentración de proteínas y rendimiento proteico se obtuvieron a una concentración de caprilato de 0,004 M, 5% de etanol, pH 6,9 y 30 min de calentamiento. En la pasteurización 10 h a 60 °C los mejores resultados se obtuvieron con caprilato de sodio 0,04 M y la mezcla de caprilato de sodio 0,02 M y acetiltriptofanato de sodio 0,02.

Palabras Claves: Termocoagulación, albúmina, caprilato de sodio.

Introducción

La albúmina ocupa una posición esencial entre las proteínas del plasma, constituyendo el 50% del total proteico de esta fuente. Su estructura y propiedades físicas están bien establecidas (1-3), haciéndose muy notable su elevada solubilidad en solventes acuosos y su estabilidad en un rango amplio de temperatura (4-9).

Además de su gran solubilidad, la albúmina es una proteína notablemente estable a temperaturas de hasta 70°C. Según estudios realizados en la Escuela de Medicina de Harvard (1946), la presencia de pequeños iones orgánicos en las preparaciones de albúmina favorece su estabilidad térmica. La capacidad estabilizante de iones como el propionato es dos veces superior a la del acetato y la máxima se logra con caprilato de sodio (5).

El caprilato de sodio es un ácido graso de cadena larga [CH₃(CH₂)₆COONa] que al igual que otros ácidos grasos, se une con elevada afinidad a sitios específicos de la molécula de albúmina. Su capacidad de interacción con sitios específicos de la albúmina mejora la estabilidad de esta molécula y la protege de la desnaturalización por efecto del calor y condiciones de pH extremos, preservando la estructura nativa de la molécula proteica.

Desde la década del 70 hasta el presente, se han descrito diferentes procedimientos para obtener y purificar albúmina, por termocoagulación, a partir de diversas fuentes dentro de las cuales se incluye: sangre hemolizada, placenta (10), las fracciones IV y V obtenidas por el método de fraccionamiento alcohólico de Cohn

(11), plasma (12) y otros materiales biológicos que contienen esta proteína.

La termocoagulación, descrita por primera vez en 1944, fue establecida por Schneider en 1975 como una variante alternativa para la obtención de albúmina para uso terapéutico a gran escala (13).

Este método también puede ser útil en la purificación de albúmina humana o animal para uso diagnóstico y medios de cultivo. (Cádiz A. Marzo, 1999 (Instituto Finlay, comunicación personal). El estudio de las combinaciones posibles de valores de concentración de caprilato de sodio y etanol, resulta muy interesante para establecer las condiciones óptimas del proceso de purificación a nivel de laboratorio y a escala preparativa, así como su posterior pasteurización.

Materiales y Métodos

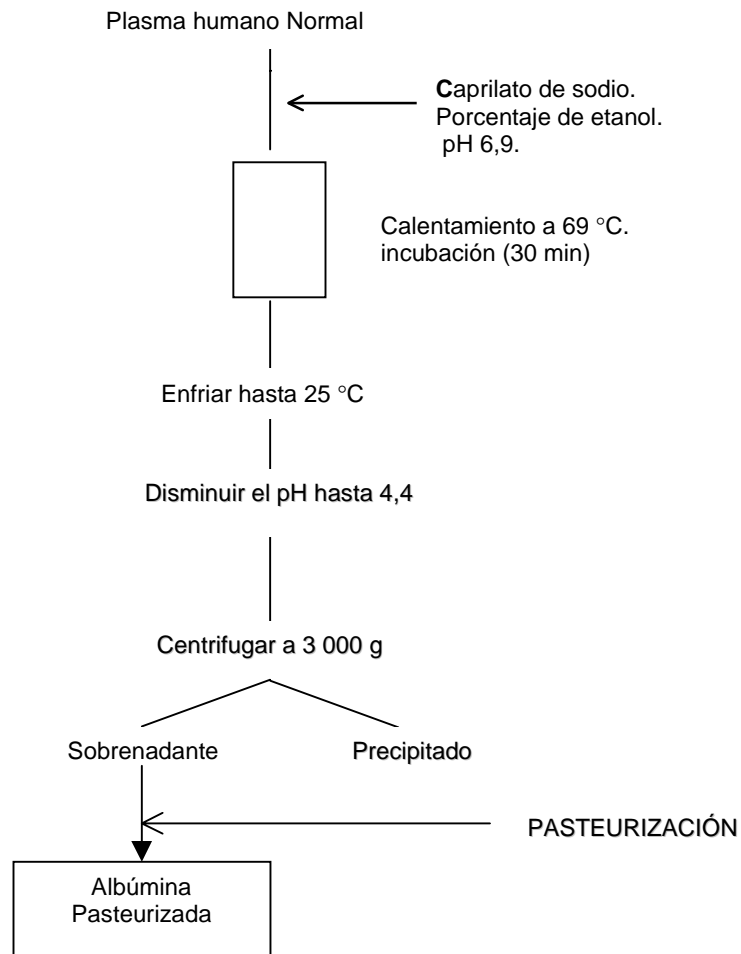
- Plasma humano normal

Se emplearon bolsas de plasma humano normal obtenidas en el Banco de Sangre de Marianao. Este plasma fue analizado según criterios de la OMS para la producción de hemoderivados (14), siendo mezclados y homogeneizados para igualar el material de partida en todas las experiencias realizadas.

-Ensayo de Termocoagulación

El procesamiento se realizó siguiendo el procedimiento que mostramos en la Figura 1.

Figura. 1. Diagrama de flujo general del proceso



Para realizar los experimentos de calentamiento a 69 °C, se utilizó un baño termostático HAAKE Fisons W 26 con circulación constante. Las muestras termocoaguladas se enfriaron a temperatura ambiente hasta 25 °C y se ajustó el pH, hasta 4,4 con HCl 1N, empleando un pHmetro RADIOMETER COPENHAGEN PHM 83.

La centrifugación se realizó a 3000 g en una centrífuga BECKMAN refrigerada. A los sobrenadantes obtenidos se les determinó la concentración de proteínas por el método de Biuret (15).

- Estudio de la viscosidad

A partir de albúmina obtenida por termocoagulación y ajustada a 100 mg/mL se realizaron tres ensayos de pasteurización empleando como estabilizante diferentes concentraciones de caprilato y acetil-triptofanato de

sodio durante el calentamiento 10 horas a 60 °C. A las muestras resultantes se les determinaron la viscosidad relativa frente a agua destilada antes y después de pasteurizar, empleando un viscosímetro de Ostwald.

- Inmunolectroforesis

La técnica de inmunolectroforesis se llevó a cabo según el método descrito por Grabar y Williams (16), utilizando suero antitotal de plasma humano obtenido en el Instituto de Angiología y Cirugía Vasculat, de Ciudad de La Habana. La corrida se realizó aplicando una corriente de 30 mA y 150 V, generados por una fuente Pharmacia LKB-EPS 500/400.

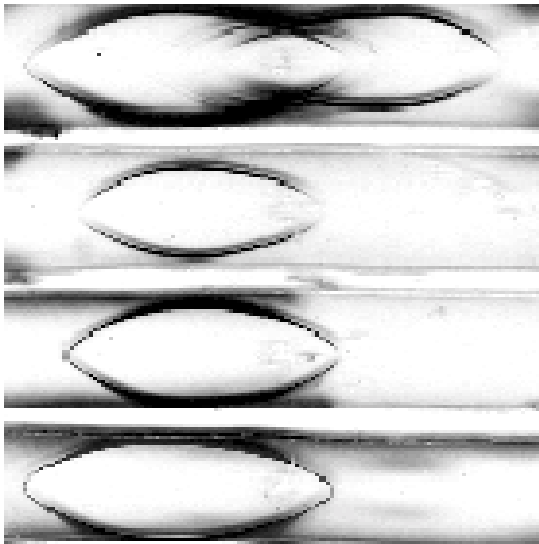
Resultados y Discusión

Al trabajar con 0,002 M de caprilato (Tabla 1), el rendimiento máximo fue de 17,8 g/L; sin embargo el rendimiento proteico máximo a 0,004 M y a 0,006 M (Tabla 1) es superior al de 0,002 M y cercano al valor referido por otros autores. Esto se debe a una mayor estabilización de las moléculas proteicas al ser calentadas a concentraciones de 0,004 M de caprilato o superiores. Sin embargo el empleo de concentraciones superiores, ha demostrado que pueden estabilizarse proteínas del plasma que nos interesa eliminar y constituir contaminantes del producto final.

Tabla 1. Termocoagulación selectiva durante 30 min a 69 °C, pH 6,9, a distintas concentraciones de estabilizante y etanol

Caprilato de Sodio (M)	Etanol (%)	Rendimiento (g/L)
0,002	5	16,0
	9	17,8
	15	9,7
0,004	5	29,2
	9	27,4
	15	18,1
0,006	5	27,9
	9	28,1
	15	20,4

Figura. 1. Inmunolectroforesis de las muestras de albúmina obtenidas con 30 min de incubación y a diferentes concentraciones de caprilato de sodio. En todos se utilizó antisuero total humano.



Plasma humano normal

- 0,002 M de caprilato,
- 9% de EtOH, 30 min
- 0,004 M de caprilato
- 5% de EtOH, 30 min
- 0,006 M de caprilato
- 9% de EtOH, 30 min

La pureza de las fracciones obtenidas durante el proceso de termocoagulación se muestra en la (Figura 1). Las muestras usadas en la corrida corresponde a los valores de mejor rendimiento a distintas concentraciones de estabilizante, donde podemos observar que la albúmina es el constituyente mayoritario.

Según lo reportado en la literatura los mejores rendimientos se deben obtener a 0.004 M de caprilato de sodio y 9% de alcohol (Tabla 2), sin embargo nuestros mejores resultados corresponden a 5% de etanol (Tabla 1), donde se logra eliminar la mayor cantidad de

contaminantes manteniéndose estable la albúmina. A concentraciones superiores de 0,004 M de caprilato de sodio se observa que comienzan a aumentar los contaminantes, esto se debe a que el caprilato de sodio además de estabilizar la albúmina también evita que se desnaturalicen y precipiten moléculas contaminantes.

La contribución del alcohol a la coagulación de las proteínas contaminantes en la termocoagulación selectiva se detalla en la (Tabla 2) que muestra una relación entre el porcentaje de albúmina y la capacidad precipitante del etanol.

Tabla 2. Rendimiento proteico, cuando se trata el plasma humano a 69 °C y pH 6,9; 0,004 M de caprilato de sodio a diferentes % de etanol

Rendimiento proteico (%)	Contenido de etanol (%)
97	5-6
96	7
96	8
95	9
92	10
90	11
82	12
75	13
68	14
63	15

Al trabajar con 15% de alcohol el rendimiento es extremadamente pequeño (Tabla 1), por ello planteamos que el porcentaje de etanol es un factor limitante, con una concentración crítica a partir de la cual ejerce un efecto destructivo sobre la estructura de las moléculas proteicas ya desplegadas por el efecto del calor y como consecuencia, el efecto del etanol, supera la capacidad estabilizadora del caprilato de sodio.

La combinación de estos parámetros (Estabilizante-Etanol) permite obtener preparados de albúmina libres

de isoaglutininas, los cuales se pueden utilizar para potenciar la aglutinación específica de eritrocitos humanos por anticuerpos. Los anticuerpos de la clase IgG, particularmente aquellos del sistema Rh, generalmente no reaccionan en soluciones salinas isotónicas (anticuerpos incompletos); sin embargo, aglutinan las células rojas cuando se introducen en la mezcla de reacción ciertos coloides tales como la albúmina, de ahí su importancia en la determinación de antígenos sobre los hematíes. Esta propiedad unida a la ausencia de otros contaminantes permite también su uso en la suplementación de medios de cultivo.

Al igual que para la albúmina de uso humano en la terapéutica clínica, la albúmina de uso reactivo debe ser un preparado seguro que no permita la transmisión de virus patógenos por el preparado. Es por ello que se considera su calentamiento 10 horas a 60 °C (pasteurización) como un requisito indispensable dentro del proceso tecnológico de obtención de esta proteína (17). La pasteurización sin embargo puede conllevar un aumento de la desnaturalización de las moléculas produciéndose agregados que atentan contra la calidad del producto.

En este sentido, y utilizando las experiencias de la producción de albúmina terapéutica, empleamos como estabilizantes el caprilato de sodio y el acetil triptofanato de sodio, aminoácido muy empleado en la estabilización de soluciones proteicas.

Tabla 3. Valores de viscosidad relativa antes y después de pasteurizar con el empleo de estabilizantes

Concentración de estabilizante	Viscosidad antes	Viscosidad después	Diferencia	D.O. 650 nm
Sin estabilizante	1,75	gelifica	--	0,045
Caprilato de sodio 0,01 M	1,79	1,81	0,02	0,125
0,02 M	1,76	1,85	0,09	0,110
0,03 M	1,81	1,94	0,13	0,110
0,04 M	1,77	1,78	0,01	0,100
Acetilriptofanato de sodio 0,01 M	1,69	1,97	0,18	0,135
0,02 M	1,55	1,81	0,25	0,095
0,03 M	1,58	1,77	0,19	0,095
0,04 M	1,50	2,05	0,55	0,09
Acetilriptofanato de sodio 0,01 M +	1,39	1,86	0,47	0,105
Caprilato de sodio 0,01 M				
Acetilriptofanato de sodio 0,02 M +	1,71	1,81	0,10	0,065
Caprilato de sodio 0,02 M				

Existe una relación directa entre el aumento de viscosidad de las soluciones de albúminas calentadas y el grado de desnaturalización que se produce durante este proceso, que también se relaciona con el aumento

de la densidad óptica medida a 650 nm e incluso con la aparición de turbidez en el producto, pues la molécula de albúmina en su estado nativo tiene una forma cercana a la esférica con una relación entre ejes pequeña, lo que

hace que la viscosidad de las soluciones al 10% se mantenga inferior o igual a 1,75; el aumento de la viscosidad durante la desnaturalización está provocado por el aumento de la simetría de las moléculas como resultado de las rupturas de los plegamientos, con formación de cadenas largas, debido fundamentalmente a la ruptura de los enlaces disulfuros intracatenarios (18). Es interesante señalar que el acetiltriptofanato de sodio (ATS) disminuye la viscosidad de la solución antes del calentamiento, contrario al caprilato de sodio que la aumenta. Sin embargo después de pasteurizar los incrementos de la viscosidad son mayores para el ATS que para el caprilato de sodio (Tabla 3).

Cuando se utilizaron la mezcla de ambos se observó que antes de pasteurizar baja la viscosidad, pero después de pasteurizados se obtiene mucho mejor resultado con la concentración de 0,02 M en ambos estabilizantes, lo que está de acuerdo con los datos ofrecidos por otros autores para albúminas de uso terapéutico pasteurizadas al 20% de concentración. La combinación de ambos estabilizantes ofrece mayor protección frente a la agregación del producto que los estabilizantes individuales, durante el calentamiento.

Estas experiencias reafirman que estos compuestos, el caprilato de sodio y el acetiltriptofanato de sodio, incrementan la estabilidad de la albúmina contra la

desnaturalización por calor. Sin embargo, cualquier planteamiento que podamos hacer sobre su mecanismo de acción, puede ser de alguna forma especulativo, debido a que los cambios intramoleculares que ocurren durante la desnaturalización aún hoy no están totalmente comprendidos.

Los aniones de ácidos grasos como el caprilato de sodio se enlazan a los grupos cargados positivamente de la albúmina, lo cual presupone que estos grupos cargados están involucrados en la estabilización de la molécula durante el calentamiento, aunque si fuera solamente este el mecanismo se podría esperar una mayor estabilidad con el acetiltriptofanato de sodio, lo cual no ocurre. Es por ello que tenemos que pensar en una posible interacción similar a la iónica entre los grupos no polares de la albúmina y la cadena hidrocarbonada del ácido graso, por lo que parece probable que la estabilización sea el resultado de la atracción de diferentes grupos de la molécula de albúmina por las porciones polares y no polares de los aniones de ácidos grasos. Lo cierto es que esta atracción de una molécula simple de ácidos grasos por diferentes grupos de la proteína ayuda en la prevención de la separación de cadenas adyacentes de la molécula de albúmina que previene una "apertura o extensión" de la molécula, lo cual puede ocurrir en áreas seleccionadas de la misma.

Referencias

1. Evenson MA y Deutsch F. Influence of fatty acids on the isoelectrc point properties of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*. 1978; 89:341-354.
2. Nakamura K, Era S, Ozaki Y, Sogami M, Hayashi T, Murakami M. Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. *Febs Lett*. 1997; 417(3):375-8.
3. Galliano M, Minchiotti L, Laradola P, Stoppini M, Watkins S, Madison J, Putnam FW. Protein and DNA secuencia analysis of a private genetic albumin Ortonovo. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1225(1):27-32.
4. George W. Recovery of native BSA after precipitation with trichloroacetic acid and solution in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*. 1957; 79:139-141.
5. Edsall-John T. Stabilization of serum albumin to heat and inactivation of the Hepatitis virus. *Vox Sang*. 1984; 46:338-340.
6. Gallez B, De-Keyser JL, Debuyst R, Dejehef F, Neuvens L, Dumont P. The effects of pasteurization on albumin an EPR binding assay for polimeric albumin. *J Pharm Biomed Anal*. 1995; 13(12):1449-52.
7. Pico-G. Thermodynamic aspects of the thermal stability of human serum albumin. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1995; 36(5):1017-23.
8. Tanaka N, Nishizawa H, Kunugi S. Structure of pressure-induced denatured state of human albumin: Comparison with the intermediate in urea-induced denaturation. *Biochim. Biophys Acta*. 1997; 1338(1):13-20.
9. Chan B, Dodsworth N, Woodrow J, Tucker A, Harris R. Site specific N terminal auto degradation of HSA. *Eur. J. Biochem*. 1995; 227(1-2):524 -8.
10. Robert A; *et al* inventors. Process for the preparation of purified albumin by said thermocoagulation and albumin obtained by said process. Patent number 3992367. 1976.
11. Gion Yoshihiko, inventor. Method of production of albumin substancially pure. Patent number 873051916. 1986.
12. Yu L Hao y Potomac MD, inventors. Preparation of albumin using ethanol. Patent 4222934. 1980.
13. Schneider Waldermar, *et al.*, inventors. Process for isolating albumin from blood. Patent number 4156681. 1979.
14. Organización Mundial de la Salud. Requeriments for collection, processing and quality control of blood, blood

- components and plasm derivatives. *Serie de Informes Técnicos*. (Anexo 2). 1994; (840): 85-91.
15. Gornall AG, Bordwill CJ y David-MM. Determination of serum proteins by the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 1949; 177: 751-766.
16. Grabar P and Willians CA. Immunolectroforesis, micromodification according to Shedegger. Rudiments of immunochemical test methods. *Praha*. 1977; (1):34-40.
17. Ruibal IJ, Noa E, Martín RZ. *et al.* Inactivación de virus ADN envueltos en la producción de hemoderivados (Albúmina e Inmunoglobulina). *Rev. Cubana de Farmacia*. 1999; 33 (2): 89-97.
18. Volkin DB, Middaugh CR. *Stability of Protein Pharmaceuticals*. En: Ahern TJ and Manning MC, eds. *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part. A: Chemical and Physical Pathways of Proteins Degradation*. New York: Plenum Press; 1992; 8: 215-247.

Sodium Caprylate Stabilization of Albumin

Abstract

An albumin preparation was obtained from human plasma by a selective thermocoagulation method. We used different combinations of sodium caprylate and ethanol concentrations, which allowed the precipitation of globulins, while the albumin remained in solution. We establish the following parameters as constants: pH 6,9, temperature 69 °C and 30 min as the heating time. The best results of protein concentration and yield, was obtained with 0,004 M sodium caprylate, 5% ethanol, pH 6,9 and 30 min heating time. During the pasteurization for 10 h at 60 °C, the best results were obtained with 0,004 M sodium caprylate and a mixture of 0,02 M sodium caprylate and 0,02 M sodium acetyltryptophanate.

Key words: Thermocoagulation, albumin, sodium caprylate.