

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad Santiago de Compostela
España

Ácidos siálicos. X. Contenido en ácidos acilneuramínicos de varios productos dietéticos (leches maternizadas) *

por

J. A. Cabezas y A. Carrión

(Recibido para publicar el 21 de octubre de 1968)

En trabajos anteriores de este laboratorio se han estudiado la composición y modificaciones del contenido de neuramínderivados del calostro humano (4), la naturaleza y concentración de los ácidos siálicos del calostro de vaca (7) y del calostro y leche de cabra (5).

Empleándose cada vez en mayor proporción para la alimentación infantil los productos dietéticos del tipo de *leches maternizadas*, elaborados a base de leche de vaca, hemos efectuado a partir de 1964 un estudio sobre la naturaleza y concentración de los ácidos siálicos existentes en algunos de estos productos dietéticos de mayor utilización en Europa Occidental, para poder comparar los resultados con los obtenidos a partir de leche humana.

Teniendo en cuenta la materia prima de las leches maternizadas, podría suponerse ya *a priori* que la composición de las mismas diferiría, a lo menos cualitativamente, de la composición de la leche humana. Los datos conseguidos confirmaron esta hipótesis y señalaron además otras diferencias de tipo cuantitativo.

Material y métodos

Se han analizado *leches maternizadas completas*, destinadas a la alimentación infantil de los primeros meses de vida, procedentes de diversos laboratorios y que son ampliamente utilizadas en España, Francia, Alemania, Austria y otros países de Europa Occidental. (Algún ensayo se hizo también con una muestra procedente de Estados Unidos de América.) Nuestro estudio se refiere a ocho productos, que denominamos convencionalmente D-1, D-2, etc., de características teóricamente análogas.

A partes alícuotas del producto comercial, en polvo, se adicionó agua hasta reconstituir el volumen de leche, siguiendo las instrucciones del envase. A continuación se añadieron a la emulsión así for-

* Trabajo efectuado mediante ayuda del Ministerio de Educación y Ciencia.

Una nota preliminar sobre el mismo fue presentada a las «VIII Jornadas Bioquímicas Latinas», Lisboa, 1965, y recogida en la publicación de dichas Jornadas, pág. IX.

mada 4 vol. de etanol del 95 % a 0° y, después de 12 horas en reposo a 4°, se filtró el precipitado resultante. El líquido sobrenadante y el precipitado fueron estudiados por separado.

La fracción hidroalcohólica sobrenadante fue concentrada a presión reducida a 28° hasta consistencia pastosa. Después de eliminar los lípidos con éter, una parte alícuota del producto obtenido, de aspecto cristalino, fue extraída con metanol a 0°, durante 4 horas, dos veces, y estos líquidos, reunidos y llevados a sequedad a 0°. Otra parte se disolvió en agua y se purificó mediante columnas de cambio iónico, según se indica a continuación.

El precipitado glucidoproteídico se hirvió con etanol durante 30 minutos dos veces (en algún ensayo comparativo se prescindíó de estas ebulliciones).

En todas las demás etapas (purificación, aislamiento, cristalización, identificación, determinación cuantitativa de los ácidos siálicos) se siguieron fundamentalmente, para las dos fracciones, los procedimientos ya descritos (4, 6, 8).

Resultados

Por cromatografía en papel se averiguó que la fracción soluble antes indicada (tanto la porción extraída con metanol como la purificada por resinas de cambio iónico) contiene como neuraminderivados principales el triholósido neuraminlactosa, que es el que predomina, y NANA *. Ahora bien, la concentración total de los mismos respecto a la de los neuraminderivados existentes en el precipitado glucidoproteídico es muy escasa.

En el producto final, cristalizado, procedente del precipitado antes indicado, se identificaron por cromatografía en papel los siguientes compuestos, en orden de mayor a menor proporción: NANA (predominando sobre todos) y un ácido pluriacetilneuramínico (en concentración próxima a la del anterior, pero variable según el material de partida); ambos son los

más abundantes. En proporciones notablemente más bajas y casi iguales entre sí: NGNA, * neuraminlactosa y un neuraminderivado de Rf inferior que probablemente corresponde a un tetraholósido conteniendo algún resto de ácido siálico.

La proporción de NGNA respecto al conjunto de los acetilneuramínicos, todos procedentes del precipitado mencionado, fue determinada en los productos D-1 y D-2 mediante el método de KLENK-UHLENBRUCK (16) y también por elución de cromatogramas de papel. La tabla I expresa los principales resultados:

TABLA I

Concentración relativa (%) de los ácidos acilneuramínicos determinados en dos productos dietéticos

Producto	Método	Núm. determ.	NGNA	Acetilneur.
D-1	Klenk-Uhlen. Crom. papel	4	12	88
		4	5	95
D-2	Klenk-Uhlen. Crom. papel	3	6	96
		4	6	96

Se deduce que la proporción de NGNA es relativamente baja; algo inferior a la determinada en el calostro de vaca, que es del 17 % (7).

La riqueza total en ácidos siálicos de los distintos materiales analizados se indica de forma resumida en la tabla II.

Puede observarse que la cifra de ácidos acilneuramínicos referidos a 100 g de muestra original varía notablemente según los productos, llegando a ser hasta cerca del triple una de otra en algún caso. Además, no es fácil establecer paralelismo entre las concentraciones de ácidos siálicos de los productos iniciales y las concentraciones de dichos ácidos referidas a pro-

* Abreviaturas:

NANA = Acido N-acetilneuramínico.

NGNA = Acido N-glicolilneuramínico.

TABLA II

Riqueza en ácidos siálicos de ocho productos dietéticos (leches maternizadas)

Producto dietético	Ácidos siálicos (expresados en NANA) (valor medio de tres determinaciones)		
	mg/100 g producto en polvo	g/100 g proteínas totales del producto *	mg/100 ml leche reconstituida **
D-8	22,7	16,6	—
D-6	29,0	—	5,6
D-2	35,0	27,5	6,3
D-1	36,4	18,8	4,2
D-5	43,7	17,2	8,7
D-4	46,3	16,5	10,7
D-7	46,9	19,0	—
D-3	62,0	27,0	8,1

* Se toman en consideración las cifras de proteínas expresadas en los envases.

** La reconstitución se hizo con arreglo a las indicaciones para su uso.

teínas totales, sin duda a causa de la heterogeneidad de la composición de los diferentes materiales ensayados.

Discusión

Al comparar estos resultados con los relativos a la composición de la secreción láctea humana, se observa que, a diferencia de ésta, puede apreciarse la existencia de NGNA en los productos dietéticos. Otra diferencia es la referente a las concentraciones de ácidos siálicos, tanto totales como de las dos fracciones investigadas: los productos dietéticos contienen cifras de ácidos acilneuramínicos muy bajas si se comparan con las de la leche humana, las cuales oscilan entre 20 y 185 mg/100 ml, según diferentes autores (1, 4, 13, 18, 20, 22).

KIERMEIER y col. (15) recogen los datos, indicados por diversos investigadores, correspondientes a la leche de vaca. Estas cifras, en mg de ácidos siálicos/100 ml de leche, son: 2-4; 10-11; 13; 56,2; y las

suyas: 13-22. ROSASCHINO (19) ha obtenido las cifras de 26,9-55,2. (Se aprecia una amplia variabilidad, como podría esperarse dada la influencia de numerosos factores.) La media de estos valores es 23,4. Es decir, si se compara esta cifra con el valor medio de las concentraciones de ácidos siálicos por 100 ml de leche reconstituida, que es 7,2, según se deduce de la tabla II, se comprueba que el contenido en ácidos siálicos de las leches maternizadas es muy bajo, no sólo con relación al de la leche humana sino también con respecto al de la leche de vaca, que de por sí ya es más bien escaso.

Estas diferencias pueden proceder tanto de la materia prima utilizada en la elaboración de dichos productos, cuyo contenido en ácidos siálicos depende del estado y la raza del ganado vacuno, época del año (15), período de lactación (15, 19), como de los procesos mismos de transformación industrial de la leche en productos dietéticos; así, aunque de algunos trabajos (14) parece deducirse que operaciones tales como la pasteurización y esterilización en las condiciones usualmente llevadas a cabo en la industria no disminuyen el contenido de ácidos siálicos, ciertos autores (13) sostienen que la esterilización destruye dichos ácidos.

Otro aspecto que merece ser considerado es el siguiente: Desde los primeros trabajos de GYÖRGY y col. (12) se trató de relacionar a los oligósidos conteniendo NANA de la leche de mujer con el factor de crecimiento del *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus* existente en la flora fecal de los niños alimentados con leche humana y no en la de los niños nutridos con leche de vaca. Además, se ha observado que los niveles de NANA en suero y heces de los primeros son superiores a los respectivos de los segundos (22). [Es sabido que poseen también actividad *bifidus*, en orden decreciente, las leches de rata, gata, asna, perra, mona y coneja (11); pero sólo muy escasa o nula las de rumiantes (11). Asimismo, las lágrimas hu-

manas, que contienen NANA (6), y otras secreciones humanas tales como el jugo gástrico y la saliva, que igualmente lo contienen, poseen también actividad *bifidus* (11).] Pronto se averiguó que numerosas osas y oligósidos eran inactivas en este sentido (10), concretándose en 1954 que dicho factor o factores de crecimiento para el *L. bifidus* var. *Penn.* consiste en un grupo de oligósidos y poliósidos que contienen N-acetilglucosamina (9). Posteriormente (17) se ha señalado que el grupo N-acetilo no parece ser indispensable para esta actividad, ya que otros N-derivados son mucho más activos que la N-acetil-D-glucosamina e incluso que la β -etil-N-acetil-D-glucosamina, que era el factor de crecimiento que se consideraba como más potente. Se deduce de lo anterior que no ha podido establecerse una correlación directa entre NANA y factor *bifidus*.

Sin embargo, aun cuando no se conocen actualmente más que algunos aspectos del cometido fisiológico de los ácidos acilneuramínicos (2) — si se sabe, por ejemplo, que se absorben por el intestino de rata (3) —, su alta concentración en la secreción láctea humana indica la importancia de su función, a lo menos durante los primeros estadios de vida. Según se aprecia en este trabajo, la composición de las leches maternizadas analizadas se aparta considerablemente de la composición de la leche de mujer en lo que a dichos ácidos se refiere. Teóricamente, parece deseable el tratar de lograr una mayor similitud entre la composición de dichos productos elaborados y la de la secreción láctea humana.

Resumen

Se estudian la naturaleza y concentración de los ácidos siálicos existentes en ocho productos dietéticos (leches maternizadas) ampliamente utilizados como alimento infantil en Europa Occidental. Han sido identificados y determinados los siguientes neuramínderivados: Ácido

N-glicolilneuramínico (NGNA) (en la proporción de 5-12 % respecto al conjunto de ácidos acilneuramínicos, en dos productos), ácido N-acetilneuramínico (NANA) (como predominante), un ácido pluriacetilneuramínico y neuraminlactosa (ambos en proporciones variables).

La riqueza en ácidos siálicos, expresada en NANA, varía considerablemente de uno a otro producto, siendo de 22 a 62 mg/100 g de producto. Si se compara la concentración media (referida a mg/100 ml de *leche reconstituida*) con la de la leche de vaca, puede observarse que es relativamente escasa. La diferencia es aún mayor si se compara con la de la leche humana. Se comenta la influencia de varios factores en estos valores y se discute la eventual importancia de los ácidos siálicos en la alimentación infantil.

Summary

Sialic acids. X. Content in acylneuraminic acids of several dietetical products (maternized milks)

The nature and concentration of the sialic acids existing in eight dietetical products (maternized milks) generally employed as baby food in Western Europe are studied. The following neuraminderivatives were identified and determined: N-glycolylneuraminic acid (NGNA) (at the rate of 5-12 % against the whole acylneuraminic acids, in two products), N-acetylneuraminic acid (NANA) as the most important, one pluriacetylneuraminic acid and neuraminlactose (both in a variable percentage).

The yield of sialic acids, expressed as NANA, varies deeply from one product to another, between 22 and 62 mg/100 g of product. If their mean concentration (referred to mg/100 ml of «reconstituted milk») is compared with that of the cow, it may be observed that it is relatively poor. The difference is bigger yet if their concentration is compared with that of human milk. The influence of several factors in those values are commented and the eventual importance of sialic acids in the infant food is discussed.

Bibliografía

1. BÖHM, P. y BAUMEISTER, L.: *Hoppe-Sey. Z. physiol. Chem.*, **305**, 42, 1956.
2. CABEZAS, J. A.: *An. Real Acad. Farmacia*. (En prensa.)
3. CABEZAS, J. A., CARRIÓN, A., GÓMEZ-GONZÁLEZ, M. C. y RAMOS, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **24**, 99, 1968.
4. CABEZAS, J. A., CARRIÓN, A. y VÁZQUEZ-PORTO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 85, 1968.
5. CABEZAS, J. A., FROIS, M. D. y VÁZQUEZ-PORTO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **24**, 133, 1968.
6. CABEZAS, J. A., PORTO, J. V., M. D. FROIS, C. MARINO y J. ARZÚA: *Biochim Biophys. Acta*, **83**, 318, 1964.
7. CABEZAS, J. A., TRIGUEROS, E. y VÁZQUEZ-PORTO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 15, 1966.
8. FAILLARD, H. y CABEZAS, J. A.: *Hoppe-Sey. Z. physiol. Chem.*, **333**, 266, 1963.
9. GAUHE, A., GYÖRGY, P. et al.: *Arch. Biochim Biophys.*, **48**, 214, 1954.
10. GYÖRGY, P., NORRIS, R. F. y ROSE, C. S.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **48**, 193, 1954.
11. GYÖRGY, P., KUHN, R. et al.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **48**, 202, 1954.
12. HOOVER, J. R. E., BRAUN, G. A. y GYÖRGY, P.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **47**, 216, 1953.
13. JORDAN, J. y LÖHR, H.: *Milchwiss.*, **17**, 61, 1962.
14. KIERMEIER, F. y FREISFELD, I.: *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **128**, 267, 1965.
15. KIERMEIER, F. y FREISFELD, I.: *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **128**, 267, 1965.
16. KLENK, E. y UHLENBRUCK, G.: *Hoppe-Sey. Z. physiol. Chem.*, **307**, 266, 1957.
17. LAMBERT, R. y ZILLIKEN, F.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **110**, 544, 1965.
18. MONTREUIL, J. y MULLET, S.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 365, 1960.
19. ROSASCHINO, F.: *Arch. Vet. Ital.*, **15**, 2, 1964.
20. SCHMIDT, E.: *Z. Kinderheilk.*, **84**, 339, 1960.
21. SCHMIDT, E.: *Z. Kinderheilk.*, **88**, 122, 1963.
22. ZILLIKEN, F., BRAUN, G. y GYÖRKY, P.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **54**, 564, 1955.

