

P.- 22.575

GB 4450/BB 5086



9 APR 1962

276 324

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

276 324

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por V I N T E años

a nombre de AMERICAN VISCOSE CORPORATION, entidad norteamericana, establecida en 1617 Pennsylvania Boulevard, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos de América, por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE UNA MEZCLA LIQUIDA QUE ES SEPARABLE EN DOS COMPONENTES"

Este invento se refiere a la separación de mezclas, tal como mezclas de aminoácidos, por medio de adsorbentes constituidos por derivados de agregados de cristalitas de celulosa, particularmente derivados que contienen grupos ionizables y capaces de funcionar como cambiadores iónicos.

La preparación de aminoácidos a partir de hidrolizados de proteína es un método bastante conveniente para la obtención de estos valiosos compuestos a partir de fuentes relativamente baratas de materiales; pero no sucede así con su separación, recuperación y purificación. El invento tiene por objeto, precisamente, estas últimas operaciones, así co-

276324



5 no la separación y/o purificación de otras muchas mezclas separables. Mediante los materiales adsorbentes presentes, pueden separarse mezclas complejas de aminoácidos, tal como las que se encuentran en los hidrolizados de proteína, en ácidos individuales o en pequeños grupos de los mismos, que luego pueden separarse más por medio de una o más operaciones adicionales. Estas operaciones de separación pueden realizarse con ventajas respecto a los procedimientos anteriores que emplean cambiadores iónicos corrientes, incluyendo cambiadores  
10 resinosos y los que derivan de la celulosa corriente.

15 Los derivados cambiadores iónicos de agregados de cristalitas celulósicas poseen un cierto número de características físicas y mecánicas convenientes sobre los materiales corrientes. Por ejemplo, están exentos de los colores oscuros y de los olores desagradables que frecuentemente caracterizan a los materiales resinosos, y es mucho más fácil controlar su tamaño de partícula en comparación con los últimos.

20 En el caso de derivados celulósicos corrientes, su carácter fibroso conduce a un empaquetado deficiente en la columna y a la creación de espacios de aire que dan lugar a la formación de canales. Por otra parte, los derivados de agregados, por el hecho de ser de forma no fibrosa en partículas presentan buenas características de empaquetado y no originan canales.

25 Los derivados de agregados pueden tamizarse para producir fracciones de tamaño de partícula exacto y uniforme, y el tamaño mismo puede ser tan pequeño que represente un orden de magnitud diferente con relación a los derivados celulósicos fibrosos corrientes. Como es sabido, la nitidez  
30 de la separación de una mezcla de alimentación aumenta gene-

276324



ralmente al disminuir el tamaño de partícula del material  
cambiador. En consecuencia, los derivados de agregados pue-  
den tener, si se desea, un área superficial enormemente mayor  
que el de los materiales fibrosos. Estos últimos son difíci-  
5 les detamizar con exactitud, debido a su forma fibrosa, y no  
es raro encontrar partículas que poseen una dimensión del ór-  
den de 1 ó 2 micrones, pero con una longitud que se extiende  
hasta 1000 micrones o más.

Es de particular importancia el hecho de que los  
10 derivados de agregados tienen una densidad aparente mayor  
que los materiales celulósicos corrientes; así, pues, para  
pesos iguales de los dos derivados, el derivado de agrega-  
dos tendría un volumen menor, acaso sólomente de 50% o me-  
nos, del volumen del material corriente. Si hubiera que se-  
15 parar un material de alimentación por cada material, el de-  
rivado de agregados tendría que mojarse en una proporción  
mucho menor que el material corriente, y, a su vez, la pér-  
dida de retención sería mucho menor. Resulta, pues, evidente  
la ventaja del derivado de agregados, especialmente en el ca-  
20 so de mezclas de alimentación caras o componentes de las mis-  
mas; igualmente, la cantidad de disolvente eluyente sería me-  
nor, y, a su vez, habría que evaporar menos cantidad de di-  
solvente del compuesto eluido.

Los derivados de agregados tienen la ventaja parti-  
25 cularmente conveniente de ser reproducibles en un estado de  
elevada pureza uniforme. Esta característica no sólomente  
es valiosa para la separación de mezclas que son sensibles  
a las impurezas, sino que representa también un mejoramien-  
to sobre los derivados celulósicos corrientes cuya reproduci-  
30 bilidad varía de un lote a otro. Como es sabido, la celulosa



corriente contiene regiones amorfas distribuidas por la totalidad de sus cadenas de celulosa, cuyo contenido incluye xilanos y mananos. La cantidad de estos últimos materiales varía de una a otra celulosa, ya que esta última varía de una a otra planta y según las temporadas, y, a su vez, los derivados obtenidos de las celulosas varían del mismo modo de un lote a otro. Debido a estas variaciones, es prácticamente imposible obtener productos derivados puros o uniformes partiendo de celulosa corriente. Con relación al contenido de ceniza, los derivados de agregados de cristalitas pueden tener un contenido de cenizas de menos de 500 p.p.m., e incluso menos de 100 p.p.m., mientras que los derivados celulósicos corrientes pueden tener un contenido de ceniza que suba hasta 800 p.p.m.

En el caso de mezclas de alimentación separables, del tipo de los aminoácidos o las proteínas, los derivados de agregados pueden presentar una capacidad adsorptiva mayor que la resina y que los materiales de derivado celulósico corrientes. Además, estas mezclas de alimentación, o componentes de las mismas, pueden desorberse de los derivados de agregados bajo condiciones suaves, es decir, el disolvente eluyente o desorbente puede ser un producto químico suave que no ataque a los componentes de alimentación ni al derivado.

En virtud de estas ventajas, y de otras que se apreciarán más adelante, los derivados de agregados de cristalitas pueden proporcionar una acción separadora mejor con respecto a muchas mezclas de alimentación.

Los derivados de cambio iónico de los agregados pueden comprender tanto cambiadores catiónicos como cambiadores aniónicos.



27 3-4

85 ADP

—

Son cambiadores catiónicos convenientes los derivados carboxílicos de los agregados de cristalitas de celulosa, incluyendo los 6-carboxil- y los 2,3-dicarboxil derivados; derivados mixtos que contienen carboxilo y aldehído, de los agregados; y los derivados carboxi-éter de los agregados, tal como los derivados carboximetilo, carboxietilo y otros derivados carboxialcoholo. Entre otros materiales útiles se incluyen los derivados éster de ácidos inorgánicos, tal como los derivados fosfato y sulfato de los agregados; igualmente, los derivados éster de las series fosfonoalcoholo, sulfalcoholo y sulfinoalcoholo, tal como los derivados fosfonometilo, sulfometilo, sulfietilo y sulfinometilo. Los derivados sulfalcoholo contienen grupos ácido sulfónico. Otros derivados que pueden citarse son los ésteres de ácido fosforoso, los ésteres de ácido bórico, y los ésteres de ácido sulfuroso; igualmente, ésteres de ácido orgánico, tal como los ésteres ftalato, sulfinato y oxalato. Entre otros ésteres figuran los ésteres de ácido sulfónico y de ácido carboxílico donde las unidades del tipo  $-RSO_3H$  y  $-RCOOH$  están unidas al carbono carbonílico del grupo éster  $-OOC-$  a través de los radicales R, siendo este último un radical hidrocarbonado conveniente.

Entre los cambiadores aniónicos se incluyen éteres alcoholaminoalcoholo de los agregados donde las unidades alcoholílicas pueden tener de 1 a 6 o más átomos de carbono; por ejemplo, tales derivados incluyen los éteres dietilaminoetilico y trietilaminoetilico de los agregados. Otro derivado de este tipo es el éter dietilamino-(2-hidroxi-propílico). Otro cambiador aniónico adicional es el material formado por la reacción de epíclorhidrina y trietanolamina con los



275324 49

agregados en presencia de sosa cáustica. Igualmente, los mono-  
y di-urea derivados de los agregados. Como ejemplos de deri-  
vados que contienen grupos básicos, pueden citarse los éste-  
res alcohilaminoalcohílico y alcohilamino dialcohílicos de  
los agregados.

5

Como puede apreciarse evidentemente, algunos de los  
derivados tienen el grupo ionizable directamente unido a las  
unidades anhidroglucosa de los agregados de cristalitas, mien-  
tras que otros tienen dicho grupo en el extremo de una cadena  
que está unida en su otro extremo a las unidades anhidroglu-  
cosa.

10

Los agregados de cristalitas celulósicas a partir de  
los cuales se obtienen los diversos derivados son agregados  
pequeños, preferiblemente desintegrados, de celulosa de gra-  
do de polimerización nivelado (G.P.). Estos pequeños agrega-  
dos desintegrados, sus propiedades y un método para la desin-  
tegración de la celulosa de G. de P. Nivelado están descritos  
en la patente americana nº 2.978.446, de fecha 4 de abril,  
1961. Son productos insolubles en ácido, obtenidos mediante  
hidrólisis ácida controlada de celulosa, y el valor del G.P.  
nivelado refleja una destrucción de la estructura fibrosa  
primitiva del material celulósico de origen. La denominación  
de "G.P. nivelado" se refiere al grado de polimerización pro-  
medio nivelado del producto celulósico medido de acuerdo con  
el trabajo de O.A. Battista, titulado "Hidrólisis y crista-  
lización de celulosa", Vol. 42, INDUSTRIAL AND ENGINEERING  
CHEMISTRY, páginas 502-7 (1950).

15

20

25

Es preferible que los agregados de partida tengan un  
tamaño de partícula de 5 micrones o menos, independientemente  
de que hayan sido molidos o no. Como la producción de tamaños

30

276324



de partícula de 5 micrones o menos se favorece por la abrasión, es preferible realizar dicha operación, y, si es preciso, recurrir al fraccionamiento para obtener los tamaños deseados. Pueden obtenerse tamaños de partícula de 5 micrones o menos por fraccionamiento de los agregados no molidos, aunque el rendimiento puede entonces disminuir. Los derivados útiles se caracterizan por su insolubilidad general, incluyendo su insolubilidad en agua, en varias mezclas de alimentación separables y varios eluyentes y regeneradores; estos derivados a que se alude se caracterizan además por presentarse en forma de partículas discretas, divididas, no fibrosas, de un tamaño comprendido dentro de los límites preferidos de 30 a 70 micrones, aunque pueden bajar por debajo de 30 micrones, o por debajo de 10 o 5 micrones, y si se desea, de 0,1 a 0,2 o 1 micrón o más. Estos derivados son esencialmente derivados topoquímicos en los que las cadenas celulósicas dispuestas en las superficies de los agregados están "derivadas", en vez de la totalidad de las cadenas de los agregados. En cuanto se refiere al grado de sustitución (G.S.), los derivados pueden tener un G.S. por debajo de 1,0, preferiblemente desde 0,01 a aproximadamente 0,85.

En la Solicitud de patente española núm. 276.323 se describen derivados carboxílicos, derivados que contienen a la vez radicales carboxilo y aldehído, derivados éster, derivados éter y derivados combinados de los agregados de cristalitas celulósicas y sus métodos de preparación. Como se describe también en dicha solicitud, las cadenas celulósicas de los agregados de cristalitas tienen en un extremo un grupo aldehído potencial que puede reducirse a un grupo hidroxilo o puede oxidarse a un grupo carboxilo antes de formar un deri-

276324



rivado de agregado deseado.

El invento es de particular utilidad en la separación y purificación de mezclas de alimentación que tienen componentes que contienen grupos amino, particularmente mezclas de aminoácidos de cualquier procedencia, y mezclas convenientes  
5 obtenidas por hidrólisis ácida, alcalina o enzimática de varios materiales proteínicos tanto de origen vegetal como animal, y mezclas de extractos biológicos. Entre las proteínas que pueden hidrolizarse pueden citarse como ejemplo caseína,  
10 levadura, albúmina de huevo y también albúmina obtenida de leche, pescado, elastina, y queratina; proteínas vegetales, por ejemplo, soja, edestina, zeína, gliadina, igualmente proteínas de cola, gelatina, fibroína de seda, goma de seda, hemoglobina, albumen de suero, globulina de suero, fibrina de sangre;  
15 y albumen de plasma de bovinos y mezclas de las mismas con hemoglobina, suero humano y suero de caballo.

Para separar la mezcla compleja de aminoácidos presente en un hidrolizado de proteína, es conveniente separarla primero en una serie de grupos usando, por ejemplo, un cambiador catiónico. A este respecto, es interesante señalar que los aminoácidos pueden clasificarse en cuatro grupos: (1) aminoácidos básicos, que comprenden ácidos diaminomonocarboxílicos que tienen puntos isoeléctricos que varían entre 7,59 y 10,76 y donde se incluyen histidina, lisina, hidroxilisina y arginina;  
20 (2) aminoácidos neutros, que comprenden ácidos monoaminomonocarboxílicos que tienen puntos isoeléctricos que varían entre 5,6 y 6,3 y donde se incluyen serina, treonina, prolina, hidroxiprolina, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina; (3) aminoácidos ácidos, que comprenden ácidos monaminodicarboxílicos que tienen puntos isoeléctricos que varían entre  
30



27042

794

2,77 y 3,22 y donde se incluyen los ácidos aspártico y glutámico; y (4) aminoácidos aromáticos, que comprenden fenilalanina, tirosina y triptofano. Se sobreentenderá que la separación inicial de la mezcla de aminoácidos del hidrolizado de proteína en grupos no producirá necesariamente grupos de la composición anterior, aunque, en general, se encontrará que el orden en que se separan los ácidos por el cambiador catiónico está de acuerdo con su basicidad creciente, es decir, los ácidos de naturaleza más ácida son adsorbidos menos fuertemente y tienden a salir de la columna primero, mientras que los ácidos de naturaleza más básica son adsorbidos más fuertemente y tienden a ser retenidos en la columna. Después de separación de los grupos, la separación de los ácidos individuales de un grupo puede realizarse por separado, por ejemplo, mediante un material cambiador diferente.

Los derivados de cambio iónico de los agregados de cristalinas son útiles no solamente para la separación de mezclas de aminoácidos sino también para separar péptidos y también mezclas de proteínas, incluyendo las diversas mezclas de proteínas descritas arriba e incluyendo igualmente otras mezclas de proteínas, tal como enzimas, extractos musculares, ácidos nucleicos y sus productos de degradación, etc. Son útiles en la purificación de mezclas de aminoácidos, varias proteínas, ácidos nucleicos, etc. Es de particular interés la purificación y recuperación de materiales que contienen enzimas a partir de preparaciones de hígado, riñón, corazón y bazo de animales.

Este invento es aplicable también a la purificación de ácidos orgánicos impuros, tal como las calidades comerciales en las que se suelen suministrar dichos ácidos. Es posible



27 825

un fraccionamiento del ácido impuro, por el que pueden obtenerse un fracciones definidas, materiales de peso molecular alto y bajo, así como el ácido purificado mismo. Igualmente, pueden separarse en sus componentes mezclas de ácidos.

5           En general, el procedimiento para el fraccionamiento o la separación en uno o más de sus componentes, de una mezcla de alimentación, tal como una mezcla de aminoácidos o de otros grupos componentes que contienen grupos amino, comprende colocar una solución de la mezcla que se quiere separar sobre la parte superior de la columna rellena con el material apropiado. La mezcla se eluye después a través de la columna mediante un eluyente o disolvente conveniente. Debido a los diferentes grados de asociación que pueden existir entre los componentes de la mezcla y el material contenido en la columna, los componentes descienden por ella a velocidades diferentes. Se efectúa así una separación, y se recogen fracciones sucesivas del eluyente y de uno o más componentes a medida que van saliendo por el fondo de la columna.

15           La elección del eluyente dependerá del material de la columna y de los componentes de la mezcla de alimentación, sin embargo; entre los eluyentes comúnmente empleados figuran: cloroformo, mezclas de cloroformo-metanol, alcoholes de bajo peso molecular que tienen de 1 a 5 o 6 átomos de carbono; mezclas de agua-isopropanol-butanol normal; agua; ácidos acuosos, tal como HCl 0,1 N y HCl 0,5 N; mezclas de HCl 0,1 N -isopropanol-butanol normal; mezclas de HCl 0,5 N - isopropanol-butanol normal; mezclas de ácido acético-butanol normal; mezclas de agua-ácido acético-butanol normal; mezclas de 2-etilhexilamina-agua-ácido acético-butanol normal; benceno; mezclas de agua-HCl- hidróxido sódico-ácido cítrico; mezclas de agua-



270324

acetato sódico- hidróxido sódico-ácido acético-ácido cítrico; mezclas de hidróxido sódico - ácido fosfórico; mezclas de HCl -etanol; dioxano; dimetilformamida; soluciones salinas acuosas, tal como NaCl 0,1 N y análogos. Pueden emplearse dos o más eluyentes diferentes.

5

El pH del eluyente puede ser un factor en la separación de aminoácidos, proteínas, y otras mezclas. Cambiando el pH del eluyente, se puede variar el grado de asociación de los diversos componentes de mezcla de alimentación con el material de la columna, influyendo así en la velocidad con que descienden por la misma. Pueden preferirse valores de pH para la separación eficiente de mezclas del tipo de las proteínas y aminoácidos; y estos valores pueden determinarse para una mezcla particular.

10

15

Cuando se desea una separación discontinua, el material de la columna puede retirarse de la columna en forma de un cilindro húmedo y cortarse en secciones correspondiendo cada sección a una banda de material más componentes adsorbidos, y retirándose este último por medio de un disolvente adecuado. El uso de los derivados de agregados en este último método de separación proporciona una ventaja con respecto a otros derivados celulósicos corrientes, porque los primeros, cuando se cortan en bandas, se cortarán neta y limpiamente, en tanto que los derivados corrientes, por ser fibrosos, no se cortan de modo neto y limpio, sino que tienen tendencia a desgarrarse. Conviene advertir, además, que los derivados corrientes tienden a dar bandas a lo largo de la columna que tienen límites imprecisos, como consecuencia del carácter fibroso de los derivados.

20

25

30

Puede regenerarse un material de columna haciendo pa-



276324 +9 Aun

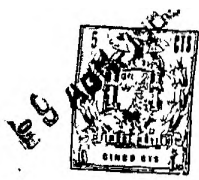
5 sar un disolvente o solución regeneradora a través de la columna que desplazará cualquier sustancia que pueda quedar todavía en la columna. Como es natural, el disolvente empleado variará de acuerdo con las sustancias contenidas en la columna y con el material de la misma. Como ejemplo, puede mencionarse la regeneración de la columna del Ejemplo 3, después de la purificación del ácido láurico usando etanol como eluyente. Esta columna puede regenerarse lavando con solución de ácido clorhídrico etánolico 0,5 N. Después  
10 de regeneración, puede desplazarse la solución regenerante por el disolvente que hay que emplear para eluyente en la operación siguiente. En general, los regenerantes adecuados abarcan HCl etánolico, etanol, soluciones acuosas de cloruro sódico, soluciones alcohólicas básicas, tal como NaOH etánolico 0,1 N; soluciones acuosas ácidas, tal como HCl 0,5N,  
15 cloroformo, etc. Otros regenerantes pueden elegirse de la lista anterior de eluyentes.

El invento puede ilustrarse por los siguientes ejemplos.

20 Ejemplo 1

Se formó una papilla dispersando un derivado carboximético de agregados de cristalitas de celulosa que tenía un grado de sustitución de, aproximadamente, 0,5 en un disolvente que comprendía un vol. de butanol, 2 vol. de isopropanol, y un vol. de agua. La papilla (que procuró un modo  
25 conveniente de colocar el derivado en la columna de cambio, aunque podría haberse introducido también en forma sec) se agregó cuidadosamente hacia abajo por el lado de una columna de vidrio de 62 cm. de largo que tenía un diámetro interno de 1,5 cm. Un tapón de vidrio, previamente introducido, sopor-

276324



5      taba el derivado en la columna. A medida que iba escurriendo disolvente de la columna, se iban añadiendo por la parte superior nuevas cantidades de la papilla. Cuando ya no se sedimentaba más derivado, se dejaba escurrir el disolvente, teniendo cuidado de evitar que se secase el derivado.

10      Se preparó una mezcla de aminoácidos puros de calidad comercial que comprendía 20 mg. de ácido d-aspartico, 20 mg. de dl-alanina, y 20 mg. de l-histidina. Esta mezcla se disolvió en un disolvente constituido por 1 vol. de butanol, 2 vol. de isopropanol y 1 vol. de ácido clorhídrico 0,1 N. El volumen total de la solución era 10 ml., que se añadió por la parte superior de la columna y se dejó que escurriera a través de la misma, cuidando de que se mantuviera el nivel de líquido por encima de la parte superior de los derivados empacquetados. Después de añadida la carga, y sin exponer la parte superior del derivado empacquetado, se introdujo disolvente de elución en la columna a una velocidad de 3 ml. por cada 25 minutos. El disolvente tenía la misma composición que la utilizada para preparar la papilla del derivado y servía como ayuda en el movimiento de los aminoácidos a través de la columna de velocidades diferentes, desarrollando así el cromatograma. El efluente de la columna se recogió en fracciones de 3 ml. usando un colector de fracciones corriente.

25      Se analizaron las fracciones del modo siguiente. Se preparó un reactivo de ninhidrina en forma de una solución al 0,1% en tampón de citrato. El tampón de citrato se preparó mezclando 200 ml. de sosa cáustica 1 N con ácido cítrico, añadiendo suficiente ácido para dar un pH de 5,0. Se mezcló cada fracción de 3 ml. con 1 ml. del reactivo de ninhidrina, y la mezcla se colocó en agua hirviendo durante 20 minutos. La apa-

30



270324

rición de un color azul indicaba la presencia de aminoácido. La ausencia de color indicaba la ausencia de dicho ácido. Pueden tabularse los siguientes datos cualitativos:

	<u>Fracciones Núms.</u>	<u>Resultado de los ensayos</u>
5	1-30	Negativo
	31-81	Azul
	82-89	Negativo
	90-119	Azul
10	120-150	Negativo
	151-179	Azul
	180-200	Negativo

Haciendo referencia al grupo de los núms. 31-81, se comprenderá que el color azul fué menos intenso en las fracciones primeras del grupo, haciéndose gradualmente más intenso, y luego menos intenso, siendo la fracción media la de color más intenso. Este fenómeno se observó también en los números 90-119 y 151-179. La intensidad del color de una fracción se interpretó como proporcional a la concentración de aminoácido que contiene. El ensayo indicó que la fracción núms. 31-81 contenían ácido d-aspártico, la fracción núms. 90-119 contenía dl-alanina, y la fracción núms. 151-179 contenía l-histidina.

Se repitió el trabajo anterior usando carboximetilcelulosa corriente como adsorbente en la columna, a excepción de que sólo se tomaron 10 mg. de cada uno de los aminoácidos en lugar de 20 mg. de cada uno de los mismos. Se pensó que este uso de un nivel inferior de aminoácidos aumentaría la sensibilidad de la mezcla al poder separador del adsorbente. Igualmente, se realizó una velocidad de flujo más



276324

9 Aug

rápida con el derivado corriente, a saber, 3 ml. por cada 5 minutos. Sin embargo, no se consiguió separación de los aminoácidos. Los datos de los ensayos cualitativos fueron los siguientes:

5

<u>Fracción Núms.</u>	<u>Resultado de los ensayos</u>
1-20	Negativo
21-39	Azul
40-200	Negativo.

10

Es evidente que los 3 ácidos salen de la columna juntos en los núms. 21-39.

Ejemplo 2

15

Se sometió un hidrolizado de caseína a tratamiento usando la columna del ejemplo anterior. Se hidrolizó caseína pura calentando a reflujo durante 6 horas en 150 ml. de ácido clorhídrico concentrado. La caseína tenía las siguientes características analíticas: residuo después de ignición, 2,0 %; humedad, 8%; proteína, 87,5%; nitrógeno, 13,7%; azúcar reductor, presente en trazas. El ácido clorhídrico era de calidad Q.P., tenía un peso específico de 1,19 y contenía de 37 a 38% de HCl. Al terminar la hidrólisis, se diluyó una parte alícuota de la solución de hidrolizado resultante con agua de manera que la concentración final de la solución alícuota correspondía aproximadamente a 4 mg. de la caseína original por ml. de solución alícuota diluida. Se tomaron luego dos ml. de la solución alícuota diluida, equivalente a unos 8 mg. de la caseína original, como alimentación para carga de la columna.

20

25

Como se ha indicado, se empleó para la separación la columna del ejemplo anterior. Primeramente se lavó la columna

30

276324



con una mezcla constituida por 1 vol. de butanol, 2 vol. de isopropanol, y 1 vol. de HCl 0,1 N. Después de este lavado, se desplazó el líquido de lavado de la columna vertiendo en ella una mezcla constituida por 1 vol. de butanol, 2 vol. de isopropanol y 1 vol. de agua. Esta operación se denomina "equilibración" de la columna. Luego se añadió el hidrolizado de caseína, que constituía el material de alimentación, por la parte superior de la columna, y cuando el nivel de la alimentación correspondía con la superficie superior del adsorbente en la columna, se introdujo disolvente de elución, siendo dicho disolvente el mismo que el que se usó en el ejemplo precedente. La velocidad de flujo del disolvente fué también la misma que en el ejemplo anterior. Se recogieron fracciones de 3 ml. y se determinó el contenido de aminoácido por el procedimiento descrito en "Métodos Colorimétricos de Análisis", de Snell and Snell, tercera edición, Van Nostrand Co. Inc., páginas 107-108 (1954). Este procedimiento es un método cuantitativo en el que la intensidad de los colores se mide con un espectrofotómetro, usándose las intensidades así medidas para calcular la densidad óptica, como se explica en la referencia citada. La densidad óptica es una medida de la absorbancia de luz por los aminoácidos; más particularmente, es el logaritmo negativo del porcentaje de luz transmitida. Representando gráficamente la densidad óptica en función de los núms. de fracciones, se obtuvo una curva que tenía un pico agudo, muy alto, para la fracción nº 40 (densidad óptica 0,61), comenzando el pico en el nº 35 y terminando en el nº 57. Las fracciones núms. 1-34 tenían densidad óptica cero. El resto de las fracciones nº 58 a nº 231, presentaban una densidad óptica pequeña pero gradualmente creciente



276324

comprendida entre los límites de 0,03 a 0,21. Los datos de densidad óptica para los núms. 35 a 57 son los siguientes:

	<u>Fracción nº</u>	<u>Densidad óptica</u>	<u>Fracción nº</u>	<u>Densidad óptica</u>
55	35	0,.03	47	0,.28
	36	0,.15	48	0,.24
	37	0,.31	49	0,.22
	38	0,.46	50	0,.17
	39	0,.57	51	0,.15
10	40	0,.61	52	0,.10
	41	0,.52	53	0,.09
	42	0,.4	54	0,.05
	43	0,.41	55	0,.04
	44	0,.38	56	0,.02
15	45	0,.31	57	0,.01
	46	0,.30		

El material de núms. 35-57 comprendía principalmente ácido glutámico junto con algo de ácido aspártico. Más específicamente, los núms. 35-46 contenían principalmente ácido glutámico y los núms. 46-57 contenían principalmente ácido aspártico. La fracción nº 40 contenía aproximadamente 4% en peso del contenido de aminoácido de la caseína original.

Ejemplo 3.

Se colocaron 2 ml. de ácido láurico impuro (calidad práctica de Eastman) en etanol (0,1 gm. de ácido láurico por 25 ml. de etanol) sobre una columna (0,8 cmx 30 cm) que se había equilibrado con etanol. El material de la columna estaba constituido por el producto de reacción de los agregados de cristalitas celulósicas con trietanolamina y epíclorhidri-



na en presencia de sosa caústica; se suponía que el material contenía grupos básicos proporcionados por la trietanolamina. La muestra se eluyó con etanol bajo una presión de 0,35 kg./cm<sup>2</sup> de nitrógeno. La velocidad de flujo fué de 2 ml. cada 5 minutos. Las concentraciones de las fracciones se siguieron por medio de un refractómetro diferencial Brice-Phoenix, Modelo BP-1000 -V. Este instrumento pudo leer la diferencia en el índice de refracción entre una muestra del eluyente y una muestra de la fracción. Así, pues, si ambas muestras fueran etanol, la lectura sobre el instrumento sería cero. Si la muestra de fracción contenía alguna impureza eluída, la lectura sobre el instrumento sería la diferencia entre los índices de refracción, indicando que había presente en la fracción alguna impureza, es decir, algún componente. Cuanto mayor es el índice de refracción diferencial, más componente hay en la fracción. En resumen, el índice de refracción diferencial es proporcional a la concentración de componente en la fracción.

	Fracción nº	Diferencia en el índice de refracción.	Fracción nº	Diferencia en el índice de refracción.
	1	0	11	0,094
	2	0,123	12	0,037
	3	0,046	13	0,025
25	4	0	14	0,018
	5	0	15	0,030
	6	0,049	16	0,021
	7	0,045	17	0
	8	0,010	18	0,006
30	9	0,133	19-30	0
	10	0,214		

276324



Si los datos anteriores se representaban sobre papel de coordenadas, se obtenía una curva que mostraba la variación del nº de Fracción con el índice de refracción diferencial; los dos primeros picos de esta curva representan impurezas que comprenden compuestos orgánicos que tienen menos de 12 átomos de carbono por molécula. El tercer pico, que corresponde a la fracción nº 10, es el más alto y representa ácido láurico puro. Dos picos pequeños posteriores representan impurezas que comprenden compuestos orgánicos que tienen más de 12 átomos de carbono.

#### Ejemplo 4

Se colocaron 2 ml. de ácido mirístico impuro (Eastman) en etanol (0,1 gm. de ácido mirístico por 25 ml. de etanol) sobre una columna rellena (0,8 cmx 30 cm) que se había equilibrado con etanol. El material de la columna era el mismo que se había empleado en el Ejemplo 3. La muestra se eluyó con etanol bajo una presión de 0,35 kg./cm<sup>2</sup>. de nitrógeno. La velocidad de flujo fué 2 ml. por cada 5 min. Las concentraciones de las fracciones se siguieron por medio del refractómetro diferencial Brice-Phoenix.

Fracción nº	Diferencia en el índice de refracción.	Fracción nº	Diferencia en índice de refracción.
1	0	19	0.075
2	0	20	0.075
3	0	21	0.075
4	0	22	0.075
5	0,028	23	0.089
6	0	24	0.084

276324



Fracción nº	Diferencia en el índice de refracción	Fracción nº	Diferencia en el índice de refracción
7	0	25	0.072
8	0,046	26	0.079
9	0,022	27	0.039
10	0	28	0.070
11	0,208	29	0.048
12	0.304	30	0.075
13	0.219	31	0.020
14	0.060	32	0
15	0.036	33	0
16	0.067	34	0
17	0.043	35	0
18	0.099		

Representando los datos anteriores sobre papel de coordenadas, la curva resultante tiene su pico máximo correspondiendo con la fracción nº 12 y representa ácido mirístico puro. Los picos menores que anteceden y siguen al pico más alto representan impurezas orgánicas, que contienen, respectivamente, menos y más de 14 átomos de carbono por molécula.

Desde un punto de vista más amplio, los derivados de agregados de cristalitas tienen aplicaciones útiles para la separación, recuperación y/o purificación de mezclas y composiciones de carácter variado. Así, por ejemplo, pueden emplearse para separar materiales como por ejemplo racematos, lípidos, drogas antihistamínicas, compuestos de cadena normal y ramificada, tierras raras; igualmente, para recuperar ácidos orgánicos como cítrico, ascórbico, tartárico, etc. a partir de vinazas y residuos de agrios, así como para purificar dichos ácidos y ácidos grasos

276324



5 saturados e insaturados, de alta peso molecular, tal como  
linolábico, linolénico, oléico, ricinoléico, esteárico, palmí-  
tico, etc. Los aminoácidos y las vitaminas pueden recuperarse  
a partir de residuos de tratamiento de alimentos enzimas pro-  
cedentes de fuentes naturales, metales de baños de tratamiento  
tal como baños de anodizado y de decapado, cobre de las aguas  
residuales de hilado del rayón cuproamonio, metales valiosos  
tal como plata de residuos fotográficos. El invento es también  
útil para purificar antibióticos, intermedios químicos, tani-  
nos, nitratos, hexosafosfatos, alcoholes complejos, hormonas,  
toxinas, reguladores del crecimiento, alcoholes grasos ele-  
vados, colorantes, etc. Pueden purificarse alcaloides, que  
comprendan bases orgánicas nitrogenadas naturales, general-  
mente aminas terciarias. Pueden aislarse pigmentos vegetales  
a partir de sus mezclas naturales; así, por ejemplo, puede se-  
pararse caroteno de otros pigmentos vegetales. Pueden separar-  
se las impurezas de metales pesados, por ejemplo, cobre y  
hierro, del vino, y mejorarse además el vino en cuanto se re-  
fiere a su pureza, a sus cualidades organolépticas y otras.  
20 De lamisma manera puede mejorarse el whisky. El agua puede  
rebajarse de dureza o desionizarse completamente.

25 Como es natural, se comprenderá que, en estas opera-  
ciones, se empleará un derivado de cambio catiónico para ad-  
sorber sustancias catiónicas, y que se empleará un derivado  
de cambio aniónico para adsorber sustancias aniónicas. Se  
comprenderá igualmente que, en algunas de las aplicaciones  
anteriores, tal como el ablandamiento o la desionización del  
agua, o la desmineralización de soluciones para liberarlas de  
impurezas minerales o para recuperar metales valiosos, el pro-  
cedimiento general comprende verter la mezcla de alimentación,  
30



27032

por ejemplo una mezcla de la que quieren separarse las impurezas, en la columna de adsorbente. El efluente será la alimentación desmineralizada, mientras que las impurezas minerales o metálicas quedan retenidas en la columna y pueden separarse convenientemente.

Es interesante un experimento realizado con una mezcla de colorantes. Se mezclaron aproximadamente 50 mg. de cada uno de los tres colorantes acuosolubles siguientes en 250 ml. de agua: Amarillo Parakeet No. 5, Rojo Parakeet nº 2, y Verde Parakeet nº 1. Se montaron entonces dos columnas: una que contenía carboximetil celulosa corriente en forma fibrosa y la otra que contenía agregados de cristalitas de carboximetil celulosa en forma de partículas, no fibrosa. Se añadió la misma cantidad de mezcla colorante por la parte superior de cada columna al mismo tiempo y luego se la dejó descender sencillamente por gravedad. Al cabo de unas dos horas, se examinaron las dos columnas. En la columna que contenía el derivado celulósico corriente, la parte más inferior de la columna, que comprendía aproximadamente  $1/5$  de la longitud, estaba sin mojar; inmediatamente encima había una banda amarilla que abarcaba aproximadamente  $2/5$  de la columna, y, encima de ésta, había una banda verde que abarcaba aproximadamente también  $2/5$  de la columna. En la columna que contenía el derivado de agregados, la porción más inferior de la columna, aproximadamente  $1/5$  en la longitud estaba sin mojar; por encima había una banda azul ancha que constituía aproximadamente  $1/5$  de la columna; por encima de esta última había tres bandas estrechas de color verde claro, par-

do rojizo y verde claro, respectivamente; por encima de la banda últimamente mencionada había una banda azul claro an-



cha que abarcaba aproximadamente  $1/5$  de la columna; y finalmente, en la parte superior de la columna había una banda verde de bastante anchura. Resultó evidente que el derivado de agregados fué capaz de separar la mezcla de colores en un mayor número de componentes; además, este derivado no acusaba formación de canales, y las bandas estaban netamente definidas, en tanto que el derivado de celulosa corriente presentaba anamalgamos y bandas no bien definidas.

Como se ha indicado arriba aunque el uso de agregados de cristalitas celulósicas que tengan propiedades de cambio iónico es el preferido, hay otros derivados de los agregados de cristalitas que, aunque no muestran una acción de cambio iónico, a causa de la falta de grupos ionizantes, son, de todos modos, útiles como adsorbentes para la separación, purificación, recuperación, o algún otro de los tratamientos de las mezclas de alimentación arriba descritas. Estos últimos derivados son efectivos por la intervención de la adsorción, enlace hidrógeno, y/o fuerzas de van der Waals, y se preparan también de acuerdo con la solicitud de patente española núm.

Todos los derivados aquí descritos de los agregados de cristalitas pueden molerse en presencia de agua para formar un gel y de esta forma son convenientes para uso en electroforesis de gel para separación de mezclas, purificación de puestos impuros, recuperación de compuestos deseados, etc.

Otra ventaja de los derivados de agregados del tipo de cambio iónico es el hecho de que los iones cambiables son más accesibles que en el caso de los materiales de derivados celulósicos corrientes y del tipo resina. En los materiales de tipo resina, el cambiador no suelo ser un polímero

276324



5 de cadena larga, sino un polímero de enrejado tridimensional que tiene muchos iones cambiabiles situados de tal manera en el interior amorfo que es inaccesible a los iones de intercambio y al medio de elución. Y, en los derivados celulósicos corrientes, la presencia de grupos ionizables en el interior de las regiones amorfas o matrices tiende a hacerlos menos accesibles. Como resultado, los derivados de agregados, debido a la mayor accesibilidad de sus grupos ionizables situados en la superficie, tienden a dar una mayor velocidad de cambio.

10 Otra consideración reside en la tendencia de algunos materiales corrientes a hincharse durante el uso, siendo de destacar que los derivados de agregados se hinchan en agua mucho menos que los derivados de celulosa corrientes. Probablemente es aún de más importancia el hecho de que el hinchamiento de estos últimos derivados es difícil de controlar, si no imposible, factor que se cree que está relacionado con la presencia de las regiones amorfas en las cadenas moleculares de los derivados. La objeción al hinchamiento es que, si es suficientemente amplio, desarrolla una resistencia indeseable al flujo de alimentación o eluyente. Cuando es difícil de controlar el hinchamiento, es obvio que la resistencia al flujo puede llegar a constituir un factor importante.

25 A diferencia de los materiales de tipo resina, los derivados de agregados son inertes frente a muchos disolventes, y, por tanto, proporcionan una gran variedad de eluyentes y también de regeneradores susceptibles de empleo. Por estar menos expuestos a los ataques, los derivados en cuestión se regeneran más fácilmente que los materiales de tipo resina.

30

276324



Además, a causa de la ausencia de regiones amorfas, pueden regenerarse por medio de una mayor variedad de agentes que los derivados celulósicos corrientes. Estos últimos, debido a la presencia de las áreas amorfas, están expuestos al ataque por regeneradores ácidos.

Es de particular interés el hecho de que los derivados de agregados tienen un carácter hidrófilo. Esto es evidente puesto que los agregados de cristalitas celulósicas, a partir de los cuales se preparan los derivados, contienen un gran número de grupos hidróxilo, parte de los cuales por lo menos sobreviven a la conversión de los agregados en derivados. Como consecuencia de su carácter hidrófilo, estos derivados son de valor especial para la separación de mezclas de alimentación cuyos componentes contienen grupos amino.

Tal como aquí se usa, la denominación de "adsorbente" se entiende que denota tanto los derivados que tienen grupos ionizables como aquellos que no poseen dichos grupos.

Las denominaciones "mezcla líquida" o "mezcla fluida" se entiende que abarcan mezclas de alimentación separables que están en un estado líquido o licuado, o fluido, y abarcan soluciones, soluciones coloidales, suspensiones coloidales y papillas. Estas denominaciones abarcan también mezclas fundidas, si dichas mezclas no son líquidas a temperaturas normales. Las suspensiones coloidales pueden incluir suspensiones de un virus, enzima, proteína, polipéptido, etc., separable. Además, algunas mezclas de alimentación líquidas pueden introducirse en una columna de separación sin que primeramente se haya preparado una solución con la ayuda de un disolvente.

Esta Solicitud, que corresponde a la presentada en

276324



los Estados Unidos de América el 10 de Abril de 1.961, bajo el número 101.677, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTIUN años, son los siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la separación de una mezcla líquida que es separable en dos componentes, por lo menos, tal como una mezcla de componentes que contienen el grupo amino, que puede ser una solución de la mezcla, caracterizado porque la mezcla se pone en contacto con un derivado de agregados de cristalitas de celulosa que tienen un grado de polimerización nivelado y separando después en una fracción, por lo menos, que contenga menor número de componentes que la mezcla, siendo retenida una porción de dichos componentes sobre el derivado de agregados.

15

20

2ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se eluye el derivado de agregados con un disolvente de elución.

25

3ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó la 2, caracterizado porque una solución acuosa de aminoácidos se separa en componentes aminoácidos.

4ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la 2, caracterizado porque la mezcla es una mezcla de proteínas.

30

5ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación

276324

9 ABR



ción 1 o la 2, caracterizado porque la mezcla comprende por lo menos un ácido graso.

6º.- Procedimiento para la separación de una mezcla líquida que es separable en dos componentes.

5

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintisiete hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 9 ABR. 1962

10

P.A.

Alberto de Elzaburu  
Por Poder