

338226

18



MEMORIA DESCRIPTIVA
=====

Correspondiente a una Patente de Introducción por 10 años, para todo el territorio español y protectorados por:

" PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE CATALASA DE HIGADO DE CABALLO "

A favor de: Laboratoires Sarget-Ambrine, Sociéte Anonyme, de nacionalidad francesa, 4 rue Poquelin-Molière á BORDEAUX (Francia) y Roncales, S.A., de nacionalidad española, residente en ZARAGOZA, Tenor Fleta, 5.

=====:

La presente Patente de Introduccion concierne a un procedimiento de preparacion de la catalasa extraida del higado de caballo, igualmente designada bajo el nombre de hépatocatalasa de caballo.

5

Se propuso ya anteriormente, preparar una catalasa sometiendo el higado de caballo a un tratamiento de ex-

338226



tracción y precipitación por la dioxano. Sin embargo en éstos metodos de preparacion la presencia del glu
cógeno, procedente del protoplasma de las celulas -
10 hepaticas del animal, resultaban sumamente engorroso,
pues entrañaba la necesidad de recurrir a numerosas
filtraciones sucesivas, para obtener un filtrado lim
pido. Estas numerosas filtraciones son, por otra -
parte, practicamente imposibles de realizar, sin per
15 der las ventajas esperadas, es decir, la obtencion -
de una catalasa de buena calidad, con buen rendimien
to y en forma economica. Además, en dichos metodos -
de preparación, se añade dioxano diluido, poniendolo
directamente, desde el comienzo de la operación, en
20 contacto con el higado. Esta manera de proceder pre
senta el inconveniente de ocasionar, así, una desna
turalizacion de las proteinas de la pulpa del higado,
que tiene por efecto bloquear la catalasa en su titu
lo inicial. De una manera general, aplicando los me
25 todos descritos, no se obtiene un filtrado limpio y
el precipitado final de catalasa se disuelve mal en
agua y contiene impurezas, o mas bien, está contami
nado por diversas sustancias utilizadas en su trata
miento final y que tienen porefecto hacerla impropia
30 para la utilización, con fines farmaceuticos por -
ejemplo.

Conforme a la presente patente, se ha perfeccio
nado un procedimiento de preparacion de la hepato-ca
talasa de caballo, permitiendo evitar los inconve- -
35 nientes precitados y obtener la hepato-catalasa de -
caballo de gran calidad, teniendo propiedades fisi
cas y quimicas, rigurosamente, definidas y controla
bles por el método de dosificación utilizado durante



338226

40 la realización del procedimiento, con buen rendimiento y de forma económica.

Se ha encontrado en el cuadro de la presente patente que se obtienen las ventajas ya citadas y, particularmente, que se evita la desnaturalización de las proteínas de la pulpa de hígado, cuando se ataca, inicialmente, el glucógeno del hígado, cuya presencia molesta, por un encima, notablemente por la amilasa de la cebada germinada, antes de realizar la adición de dioxano. Se ha encontrado, igualmente, que era preferible añadir dioxano puro, en varias adiciones, efectuando éstas operaciones en intervalos, preferenciales de temperatura. El ataque del glucógeno se realiza sobre una suspensión de pulpa de hígado de caballo en agua, ya que la catalasa es hidrosoluble. Se obtiene, al final de la operación, un precipitado puro de catalasa, que sedimenta bien y que es fácilmente soluble.

El procedimiento de la presente patente se caracteriza porque se pulveriza el hígado fresco de caballo para transformarlo en pulpa de hígado, añadiendo a la pulpa de hígado agua destilada, previamente enfriada, se homogeneiza la suspensión obtenida y se la deja reposar enfriandola; se procede, luego, a la adición de amilasa de cebada, germinada, agitando a 20°C, se enfría, de nuevo, y manteniendo el enfriamiento y la agitación, se realizan tres adiciones de dioxano pura, en cantidades diferentes, centrifugando y dejando reposar la mezcla recogida después de cada adición de dioxano. Todas las operaciones, excepto la de la adición de amilasa, cuya acción enzimática es favorable a 20°C, deben realizarse, de preferencia, entre 0 y 4°C, debido a la fragilidad de la catalasa.



338226

75 La primera adición de dioxano se efectua en la -
cantidad, en volumen, de un 50% en relación con el vo-
lumen de mezcla, despues de la adición de la amilasa,
la segunda adición de dioxano se realiza en la canti-
dad, en volumen, de un 23% en relación con el volumen
de filtrado despues de la primera centrifugación y la
tercera adición de dioxana se efectua en la cantidad,
en volumen, de un 11% con relacion al volumen de fil-
trado despues de la segunda centrifugación. La amilasa
80 utilizada es un producto definido en el Codex 1949 y
su titulo amilolitico debe ser con un minimum igual a
100.

85 El dioxano puro utilizado es un liquido incoloro
de densidad $D_{15}^{20} = 1,042$, con un punto de ebullición
de 101°C , exento de piroxido, como lo muestra la au-
sencia de coloracion al añadir una solucion de ioduro
de potasio en medio acido.

90 Se indica a continuacion un ejemplo de la manera
de obrar del procedimiento de la patente, a titulo de
ilustracion, solamente, y sin limitar de ninguna mane-
ra, por dicho ejemplo, el cuadro y el espiritu de la
patente.

Ejemplo:

95 Se transforma el higado fresco del caballo en pul-
pa y se añade, a la pulpa, agua destilada, previamente
enfriada, para que la temperatura de la mezcla esté -
comprendida entre 0 y mas 4°C .

100 Se homogeiniza la mezcla con el ultra-pulveriza-
dor durante 20 minutos dejandola en reposo durante 18
horas, en una cámara fria entre 0° y mas 4°C , se aña-
de, entonces, la amilasa de cebada germinada, agitando
por medio de un batidor electrico, durante 1 hora y -
15 minutos a 20°C .

338226



105 Al cabo de éste tiempo, se lleva la temperatura a 4°C y siguiendo con la agitación, se añade dioxana pura por pequeñas porciones sucesivas, en cantidad - igual a la mitad del volumen de la mezcla. Esta adición debe durar unos 15 minutos. Se deja reposar durante 18 horas a la temperatura de 0 a mas 4°C.

110 Entonces se separa la pulpa de hígado del líquido por agotamiento en una centrifuga enfriada a la temperatura comprendida entre 0° y mas 4°C, se añade entonces, al filtrado 23% de dioxano puro (en volumen) en porciones sucesivas con agitación constante. Cuando 115 se ha incorporado toda la dioxana se sigue agitando durante 10 minutos y se deja reposar durante 18 horas, a una temperatura comprendida entre 0 y mas 4°C.

Esta segunda adición de dioxano, en cantidad ligeramente diferente, se hace, tambien, de la misma manera 120 que la anterior, dado los grandes volúmenes sobre los que se opera y, en particular, los tiempos de mezcla - son en éste caso, muy rigurosos.

Se centrifuga, entonces, en una centrifugadora separadora enfriada a mas 4°C, con el fin de obtener un 125 líquido claro. Se añade, de nuevo, 11% (en volumen) de dioxano puro, sin dejar de agitar y, despues de diez - minutos de agitación, se deja reposar en cámara fría - de 0 a mas 4°C, durante 3 horas.

Esta última adición de dioxano provoca la precipitación de la catalasa. No se deja en contacto la 130 dioxano mas que 3 horas para evitar la precipitación de las impurezas y se centrifuga, sencillamente, para obtener el precipitado que sedimenta muy bien.

Se centrifuga, de nuevo, en la centrifugadora separadora enfriada a mas 4°C para separar el precipitado - 135

338226



formado y se recoge éste precipitado.

140 El precipitado se pone, entonces, en solución en un tampón al fosfato 0,05 M con pH 7, enfriado entre 0 y más 4°C, por ser mejor la solubilidad de la catalasa en estas condiciones.

La cantidad del tampón al fosfato está en función de la cantidad del precipitado obtenido. Se obtiene, así, la solución madre de hígato-catalasa, que se titula por el método descrito a continuación.

145 Se puede conservar la solución madre así obtenida o se la puede liofilizar, después de la adición, eventual, de agentes estabilizantes.

150 Dosificación de la hígato-catalasa.— La actividad enzimática de la hígato-catalasa puede dosificarse, por ejemplo, por medio del método siguiente puesto a punto en el cuadro de la patente.

155 Principio de la dosificación.— La dosificación enzimática debe consistir en una medida de la velocidad de reacción de la enzima sobre un sustrato, siendo el sustrato de la enzima agua oxigenada N/20 en un tampón al fosfato 0,01 M con pH 7.

160 Dosificación.— La dosificación se realiza a la temperatura ambiente y dado que la hígato-catalasa se inhibe por su sustrato, para obtener la destrucción del agua oxigenada, proporcional en el tiempo, es preciso hacer esta dosificación en un mínimo de tiempo. La velocidad de reacción es constante en los 15 primeros segundos de la dosificación.

165 Es necesario que la hígato-catalasa no haya destruido más de la mitad del agua oxigenada puesta en presencia de la enzima.

El método de dosificación del agua oxigenada debe ser rápido y continuo. Con este fin se emplea un

338226



170 micro-electrodo de platino doble, de superficie puli-
mentada y representa, aproximadamente, la superficie de
una esfera de 1 mm de diametro. Se hace pasar una co-
rriente de 0,2 o 0,3 micro amperes. Esta corriente de
175 be permanecer, rigurosamente, constante durante toda
la dosificacion. Se registran las variaciones de ten-
sion que sea necesario aplicar a los electrodos para
obtener una corriente constante de 0,2 o 0,3 micro-
ampere. Las variaciones de tension son del orden de
100 a 200 mili-voltios.

Tecnica de la dosificación.- Se ajusta el aparato
180 con agua oxigenada N/20 y N/40. Se puede, entonces,
trazar sobre grafica una recta-patron, colocando, so-
bre la grafica, en abscisas los logaritmos de las con-
centraciones del agua oxigenada empleadas (C) (N/20
y N/40), y en ordenadas los logaritmos de las tensio-
185 nes correspondientes a N/20 y a N/40 (V).

La dosificación misma se efectua de la manera si-
guiente:

Una toma de ensayo, correspondiente sensiblemente
190 te a 25.000 unidades, se disuelve en un tampon al fos-
fato 0,01 M con pH 7, y se le hace una diluición al
centesimo. Se toman 20 ml de una solucion de agua oxi-
genada N/20. Se levanta, entonces, el registrador y,
en el momento en que se añade 1 ml de la diluición
de encima, se ponen en marcha el cronometro y se con-
195 tinua la dosificacion durante 30 segundos. Gracias a
la recta-patron, mencionada antes, se conoce el loga-
ritmo de las concentraciones de agua oxigenada restan-
tes en los tiempos $t = 5$ segundos, 10 segundos, 15 se-
gundos, 20 segundos, 25 segundos, 30 segundos. Luego
200 sobre otra grafica, se lleva a abscisas los tiempos -

338226

18 MAR 1954



comprendidos hasta 60 segundos y, a ordenadas, la relacion entre los logaritmos de las concentraciones de partida C₀ y los logaritmos de las concentraciones C_x en los tiempos t= 5, t= 10, etc.

205 Se obtiene una linea que se extrapola a t= 60 segundos y se deduce asi de ella la concentraci3n del agua oxigenada restante teorica a los 60 segundos. Se deduce, de ello entonces, la concentracion del agua oxigenada destruida en 60 segundos, siendo la unidad de hepato-catalasa la cantidad necesaria de encima - que destruye, en 60 segundos, una micro-molecula de agua oxigenada. Esta dosificaci3n se realiza con un error absoluto del 3%.

215 La hepato-catalasa obtenida segun el procedimiento de la presente patente y liofilizada, se presenta en forma de polvo muy ligeramente coloreado, extremadamente soluble en agua y suero fisiologico; es apir3gina y esteril.

220 Cada frasco contiene 25.000 unidades de hepato-catalasa, un contenido total en nitrogeno de 0,733% dosificado disolviendo el contenido del frasco en 0,25 ml de agua destilada y contiene 0,05 M de fosfato. El pH de la soluci3n es 7. Las soluciones de hepato-catalasa dan una absorci3n neutra en ultra violetas en las bandas Soret.

N O T A

Se declaran de novedad en Espafia las siguientes:

R E I V I N D I C A C I O N E S
 ::=:::=:::=:::=:::=:::=:::=:::=:::=:::=:::=::=

1.- Procedimiento de preparacion de catalasa de hígado de caballo, caracterizado porque se trata la pulpa de hígado de caballo, caracterizado porque se trata la pulpa de hígado de caballo, antes de la ex-

338226



235 tracción por dioxano, por una encima destructora del
glucogeno, concretamente, aminolasa de cebada germi-
nada, pulverizando el hígado fresco de caballo para
transformarlo en pulpa y añadiendo agua destilada, -
enfriada previamente, se homogeniza la suspensión -
obtenida y se deja reposar con enfriamiento, se aña
de la amilasa de cebada germinada, agitando a unos -
240 20°C, se enfría, de nuevo y siempre con frío y agi-
tando, se realizan tres adiciones de dioxano puro -
en cantidades diferentes en cada adición, centrifu-
gando y dejando reposar la mezcla recogida después -
de cada adición de dioxano y se recoge el precipita-
do de catalasa formado después de la tercera adición
245 de dioxano.

250 2ª.- Procedimiento de preparación de catalasa
de hígado de caballo, según la reivindicación ante-
rior, caracterizado porque aparte de la adición de
amilasa que se realiza a 20°C, todas las demás ope-
raciones han de efectuarse bajo enfriamiento.

255 3ª.- Procedimiento de preparación de catalasa
de hígado de caballo, según la reivindicación primera,
caracterizado porque a la primera adición de -
dioxano se realiza en la cantidad en volumen de unos
50%, en relación al volumen de mezcla, después de la
adición de amilasa y se deja reposar, preferentemente,
durante unas 18 horas.

260 4ª.- Procedimiento de preparación de catalasa
de hígado de caballo, según las reivindicaciones an-
teriores, caracterizado porque la segunda adición de
dioxano se realiza en la cantidad en volumen de al-
rededor de 23%, en relación al volumen de filtrado
después de la primera centrifugación y se deja repo

338226



265 sar, preferentemente, durante unas 18 horas.

270 5ª.- Procedimiento de preparacion de catalasa de hígado de caballo, segun las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la tercera adicion de dioxo no se realiza en la cantidad, en volumen, de alrededor de 11%, en relacion al volumen de filtrado, despues de la segunda centrifugación y se deja reposar preferentemente, durante unas tres horas.

275 6ª.- Procedimiento de preparacion de catalasa de hígado de caballo, segun las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque despues de recoger el precipitado de catalasa se le disuelve, preferentemente en una solucion de tampon de fosfato 0,05 M con pH 7, para obtener una solucion madre de hepacatalasa de caballo, que, eventualmente, se puede liofilizar.

280 7ª.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE CATALASA DE HIGADO DE CABALLO".

Todo ello, tal como se describe y reivindica en la presente Memoria, que consta de diez . hojas, mecanografiadas por una sola cara y numeradas debidamente.

285 Madrid, 18 de Marzo de 1.967

VICENTE OCHOA
P. P.