

438483

30 JUN. 1975

P.- 60.573

Case 3128

Int. Cl. A235//C07G

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de PAUL GORAN SIGVARD LINDROOS

de nacionalidad sueca

residente en Tavastgatan 40, S-117 24 Estocolmo,  
Suecia

por: "METODO PARA SEPARAR DE UN LIQUIDO QUE CONTIENE  
SUSTANCIAS DE SANGRE LA PROTOPORFIRINA DE HIERRO  
Y SUS DERIVADOS".

La presente invención se refiere a una manera de tratar líquidos que contienen sustancias de la sangre, particularmente a una manera de separar de tales líquidos la globina contenida en el líquido, de la protoporfirina de hierro, o derivados, y/o productos de escisión de ellos.

Hay ya maneras conocidas para separar, a escala de laboratorio, el componente hierro y la globina, cromatográficamente o por extracción, en las que se usan disolventes como metil-etilcetona, acetona y dimetil-formamida (formamida).

El método cromatográfico es menos adecuado a escala técnica, y la extracción con disolventes es inadecuada para usar el producto obtenido en alimentos o piensos.

Según la presente invención, el uso de una técnica de procedimiento sencilla se hace posible usando un disolvente orgánico con propiedades deshidratantes, y añadiendo un medio con efecto de aumento de la fuerza iónica y/o de deshidratación, como cloruro sódico, sulfato sódico o sulfato amónico, benzoato sódico o poliglicol, con la posible adición de medios reguladores del pH, como ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético o ácido cítrico.

En consecuencia, la invención constituye un método técnica y económicamente practicable para separar el componente hierro de la globina, que permite el uso de la globina en alimentos y piensos.

5

Según una forma especial de ejecución de la manera según la invención, primero se separa parte del componente hierro, por ejemplo la que existe como agregado en soluciones concentradas, o adsorbida sobre material proteico, preferiblemente por centrifugación. La aglomeración se puede efectuar añadiendo, por ejemplo, cloruro sódico. Luego se precipita la globina de lo que sobrenada, así obtenido, por adición de medios de aumento de la fuerza iónica y/o de deshidratación, mientras que el componente hierro es retenido en la fase líquida, en forma fluida y/o finamente dispersada.

10

15

20

25

El ambiente creado por el alto contenido de disolvente, por ejemplo etanol, y el bajo contenido de agua, con una cierta fuerza iónica y un bajo valor del pH, es evidentemente adecuado para retener la forma finamente dispersada, y fluida, respectivamente, del componente hierro y los posibles derivados y productos de descomposición del mismo, en el líquido, mientras que la globina se deja separar por centrifugación.

La invención se ilustra en más detalle en lo que sigue , por algunos ejemplos de ejecución.

#### EJEMPLO 1

5 A 5 g de una solución de hemoglobina con un contenido de sustancia seca del 15%, y que contenía aprox. 33% de etanol, a una temperatura de -8°C, se añadió a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, una mezcla de 1,1 ml de ácido clorhídrico  
10 1 M y 5 ml de agua. Tras la adición, la temperatura era -7°C, y el valor del pH 2,5.

Se añadieron a gotas 80 ml de etanol del 94%, mientras se enfriaba a -10°C. La globina se precipitó añadiendo 0,3 ml de sulfato amónico en  
15 solución acuosa al 20%, y se separó por centrifugación a 8000 x g, durante 10 minutos. El líquido superficial era pardo vivo, y la pasta gris. La pasta se lavó en etanol del 85%, a una temperatura de -10°C y con un valor del pH de 3,1, y se separó  
20 por centrifugación; con lo que se obtuvieron aprox. 2,4 g de pasta con un contenido de sustancia seca del 23%.

#### EJEMPLO 2

25 A una solución de 36 ml de etanol del

94%, 6 ml de agua y 0,55 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$ , se añadieron a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, 2,5 g de una solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1).

5 Tras la adición, la temperatura era  $-12^{\circ}\text{C}$ , y el valor del pH 3,0.

Luego se añadieron 45 ml de etanol del 94%, y el líquido se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 10 minutos, con lo que se obtuvo una pasta en cantidad menor de 0,1 g.

10

La globina se precipitó añadiendo 0,4 ml de una solución de sulfato amónico al 20%. El pH se ajustó a 3,0 con ácido clorhídrico. El precipitado se separó por centrifugación de la manera mencionada en el ejemplo 1, con lo que se obtuvieron 0,45 g de pasta con un contenido de sustancia seca del 36%.

15

De lo que sobrenadaba se precipitó más material, añadiendo 0,4 ml de sulfato amónico, con lo que se obtuvieron 0,40 g de pasta con un contenido de sustancia seca del 42%.

20

Las pastas tenían un color gris claro. Lo que sobrenadaba tenía color pardo vivo, y no dió precipitado con ácido tricloroacético.

25

### EJEMPLO 3

5 A una solución de 20 ml de etanol del 94% y 1,1 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ , se añadieron a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, 5 g de una solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1). Tras la adición la temperatura era  $-15^{\circ}\text{C}$ , y el valor del pH 2,9.

10 La mezcla se centrifugó a  $27000 \times g$  durante 20 minutos, con lo que se obtuvo una pasta negra en cantidad de 0,9 g, con un contenido de sustancia seca de 8,3%.

15 A lo que sobrenadaba, pardo vivo, se añadieron, mientras se agitaba y enfriaba, 50 ml de etanol del 94%, a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ , y el material se precipitó añadiendo 10 ml de agua, y 1,2 ml de sulfato amónico del 20%

20 El precipitado se centrifugó a  $8000 \times g$  durante 10 minutos, y con la pasta obtenida se formó una suspensión en etanol del 94%, a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ , y se centrifugó como antes. Esto dió 1,6 g de pasta con un contenido de sustancia seca de 37,6%. Cuando estuvo seca, la pasta era gris clara.

25 Lo que sobrenadaba de la precipitación no dió precipitado con ácido tricloroacético.

#### EJEMPLO 4

A una solución de 40 ml de etanol del 94% y 1,1 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-15^{\circ}\text{C}$ , se añadieron a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, 5 g de solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1). Tras la adición, la temperatura era  $-15^{\circ}\text{C}$  y el valor del pH 2,9.

Se añadieron a la mezcla, a gotas, 5 ml de cloruro sódico al 20%, y el líquido se centrifugó a 27000 x g durante 20 minutos, con lo que se obtuvieron 1,4 g de pasta negra con un contenido de sustancia seca del 11%.

A lo que sobrenadaba se añadieron 12 ml de agua y 1 ml de una solución de sulfato amónico del 20%, tras lo cual el líquido se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos. Luego se obtuvo una pasta gris, en cantidad de 3,8 g, y con un contenido de sustancia seca del 14,6%.

20

#### EJEMPLO 5

Según este ejemplo se efectuó una extracción del componente hierro de un precipitado de globina.

A 5 g de una solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1), a una tempera-

25

tura de  $-8^{\circ}\text{C}$ , se añadió a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, una mezcla de 11 ml de agua, 4 ml de etanol y 1 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$ . Tras la adición, la temperatura era  $-4^{\circ}\text{C}$ ,  
5 y el valor del pH 2,9. El valor del pH se ajustó a 3,9 con 7 ml de una solución de hidróxido sódico 0,1M. La precipitación se realizó añadiendo 0,2 g de sulfato amónico, y la pasta pardo vivo se separó por centrifugación a aprox. 300 x g. Con la pasta fluída  
10 se formaron repetidamente suspensiones en pequeñas cantidades de etanol del 94%, con el pH a 3 y a una temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$ , y se separó por centrifugación.

Esto dió 3,05 g de una pasta gris con un contenido de sustancia seca de 18,8%.

15

#### EJEMPLO 6

De 5 g de una solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1) se precipitó la hemoglobina añadiendo 10 ml de etanol del 94%,  
20 mientras se agitaba y enfriaba a una temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se separó por centrifugación a 2000 x g durante 5 minutos, con lo que se obtuvieron 6 g de pasta roja. En el fondo del tubo de la centrífuga había un depósito de una pequeña cantidad  
25 de pasta negra.

La pasta roja se añadió a una solución de 70 ml de etanol del 94% y 1,1 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$ , mientras se agitaba y enfriaba. Tras la adición, el valor del pH era 2,9 y la temperatura  $-12^{\circ}\text{C}$ . La mezcla se centrifugó a  $27000 \times g$  durante 10 minutos, con lo que se obtuvo una pequeña cantidad de pasta negra.

A lo que sobrenadaba se añadieron 2,0 ml de una solución de sulfato amónico del 40% y 10 ml de agua. La temperatura era  $-8^{\circ}\text{C}$ , y el valor del pH 3,4.

El precipitado gris se separó por centrifugación a  $8000 \times g$  durante 10 minutos, con lo que se obtuvieron 1,5 g de pasta gris con un contenido de sustancia seca de 93,3%.

#### EJEMPLO 7

A una solución de 20 ml de etanol del 94% y 1,1 ml de ácido clorhídrico 1M, a una temperatura de  $-12^{\circ}\text{C}$ , se añadieron a gotas, mientras se agitaba y se enfriaba, 5 g de una solución de hemoglobina (los mismos datos que en el ejemplo 1). Tras la adición, el valor del pH era 2,9 y la temperatura  $-12^{\circ}\text{C}$ . La mezcla, que era de color negro parduzco,

5 fué centrifugada a 27000 x g durante 10 minutos, con lo que se obtuvieron 2,2 g de pasta negra con un contenido de sustancia seca de 2,7%, y un líquido superficial pardo claro, que luego adoptó una consistencia tipo gel.

10 A lo que sobrenadaba se añadieron a gotas, mientras se agitaba y enfriaba, 70 ml de etanol frío del 94%, y luego 0,8 ml de una solución de sulfato amónico del 40% y 8 ml de agua. La temperatura era -6°C tras la adición.

El precipitado se separó por centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos, con lo que se obtuvieron 1,7 g de pasta blanca con un contenido de sustancia seca del 36%.

15 La presente solicitud que corresponde a la presentada en Suecia con fecha 14 de Junio de 1.974, bajo el número 74 07882-5, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

## REIVINDICACIONES

=====

- 5                    Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:
- 10                    1ª.- Método para separar de un líquido que contiene sustancias de sangre la protoporfirina de hierro y sus derivados o productos de descomposición, el llamado componente hierro, de la globina, caracterizado porque el líquido se enfría, preferi-
- 15                    blemente a una temperatura de 0°C a -20°C, porque el pH del líquido se ajusta a un valor menor que 4,5, preferiblemente a un valor de 2,5 a 4,5, porque se añade a dicho líquido un disolvente orgánico con propiedades de deshidratación, por ejemplo etanol o mez-
- 20                    clas de etanol con glicol o glicerina, en cantidad correspondiente a al menos 40 por ciento en volumen basado en la cantidad total de líquido, preferiblemente al menos 75 por ciento en volumen, y manteniendo así la temperatura antes indicada, porque el componen-
- 25                    te hierro precipitado se separa de dicho líquido,

preferiblemente por adición de sales tales como cloruro potásico o citrato sódico, tras lo cual la globina se precipita del líquido.

5                   2ª.- Método según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el disolvente orgánico se añade en dos etapas, con lo que se añade en la primera etapa una pequeña cantidad del disolvente, preferiblemente añadiendo cloruro sódico u otra sustancia que favorezca la aglomeración y/o  
10                   la absorción de las partículas del componente hierro sobre el material proteico, preferiblemente desnaturalizado, tras lo cual el aglomerado obtenido se separa, por ejemplo por centrifugación, y luego se añade más disolvente orgánico, en la segunda  
15                   etapa, para la separación de la globina de la parte restante del componente hierro, que está entonces en forma disuelta y/o finamente dispersada.

                  3ª.- Método para separar de un líquido que contiene sustancias de sangre la protoporfirina de hierro y sus derivados.  
20

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

25

Esta Memoria consta de trece hojas  
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 JUN. 1975

5

P.A.

Fernando de Elizaburu  
Por Poder

10

15

25.6.75

JGM/.