



ESPAÑA

10	ES	11	463068	16	A1
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			4-10-1977		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO		6-10-1976		ITALIA
	28040 A/76				

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			GOAN		

54	TITULO DE LA INVENCION
	"METODO PARA LA DETERMINACION DE PEROXIDOS GENERADOS POR REACCIONES ENZIMATICAS Y/O QUIMICAS"

71	SOLICITANTE (S)
	Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano "SCLAVO" S.p.A., entidad italiana.

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	SIENA (Italia), Via Fiorentina, 1

72	INVENTOR (ES)
	Franco MEIATTINI

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

JUN. 1977

La presente invención se refiere a un método para la determinación de peróxidos generados por reacciones enzimáticas y/o químicas.

Es sabido que muchas reacciones se valen de la aportación de enzimas para conseguir una velocidad más elevada y, en algunos casos, una posibilidad de control más inmediata; muchas de las propias reacciones enzimáticas comportan una interacción entre el sustrato de partida y oxígeno, y uno de los productos finales es el peróxido de hidrógeno, la cantidad del cual es proporcional a la cantidad del compuesto de partida.

Por otra parte, existe también una vasta gama de reacciones puramente químicas que se verifican dando lugar, como producto final, a peróxidos, la producción de los cuales es todavía proporcional a la cantidad de compuesto hecho reaccionar en las condiciones iniciales.

Además, también es sabido que el peróxido de hidrógeno y, en general, todos los peróxidos pueden ser utilizados como sustratos para la realización de una reacción que se vale del empleo de particulares enzimas: peroxidasa y catalasa.

Tales enzimas catalizan la oxidación de apropiadas sustancias a expensas del peróxido, el cual es reducido (en el caso particular del peróxido de hidrógeno se forma agua); la sustancia oxidada, a su vez producida, será proporcional a la cantidad de peróxido presente y, por consiguiente, a la cantidad del sustrato inicial que ha intervenido en la primitiva reacción para dar

peróxido.

La entidad solicitante ha descubierto ahora un particular método, basado en el empleo de un conjunto de reactivos, que permite la determinación del peróxido y por tanto, en definitiva, la dosificación del sustrato de partida.

Tal conjunto de reactivos, empleado según el método de la presente invención, está constituido por una sustancia que actúa de sustrato reducido en la reacción con el peróxido en presencia de la peroxidasa y de un reactivo, que será definido en el transcurso de la siguiente descripción, que se oxida a expensas de la especie que se ha oxidado en la reacción preliminar con el peróxido; la sustancia oxidada final presenta una estructura tal, generalmente quinónica, que aparece fuertemente coloreada, de modo que resulta fácil determinar la presencia y, lo que es más importante, la cantidad de la misma.

Según una formulación alternativa, que constituye parte integrante de la presente invención, también puede evitarse el empleo de una sustancia reducida que deba hacerse reaccionar en primera instancia con el peróxido, o bien la misma puede formar parte del reactivo empleado, según cuanto se ha expuesto más arriba, a los fines de una revelación colorimétrica.

Entrando en los detalles del método según la invención, la sustancia reducida que debe emplearse en la reacción enzimática preliminar, catalizada por la peroxidasa, es el ferrocianuro: éste es oxidado a ferricianuro, el cual, en

una segunda fase, es puesto en contacto con un reactivo, que a continuación se denominará reactivo revelador, el cual reacciona de modo que proporcione la susodicha estructura coloreada.

5 Según puede apreciarse, el método que lleva a la determinación del peróxido emplea dos etapas, la primera de ellas enzimática; las dos pasadas pueden evitarse, según se ha indicado, eliminando el empleo inicial de ferrocianuro, y reduciendo la determinación del peróxido a una simple
10 reacción con el reactivo revelador, o bien el ferrocianuro puede entrar a formar parte integrante de este último.

 Las sustancias que componen el reactivo revelador deben contener particulares grupos químicos reactivos, por lo que pueden ser empleadas también sustancias aparentemente muy
15 diversas.

 Con el fin de obtener las características necesarias, este reactivo debe estar formado por:

- a) un componente conteniendo en la molécula al menos un anillo de carácter aromático con al menos un
20 grupo -OH de tipo fenólico;
- b) un componente con al menos un grupo reactivo ligado a una estructura derivada de la 1-fenil-5-pirazolinona.

 Según el espíritu de la invención, el reactivo revelador, que constituye la composición empleada en el método de la
25 presente invención, puede estar particularmente formado por fenol, o un compuesto análogo, y 4-aminoantipirina, o un compuesto análogo.

 Dicho reactivo puede ser preparado ya sea en solución

lista para el uso, ya sea con fenol y 4-aminoantipirina en soluciones concentradas separadas, que deban mezclarse y diluirse antes del uso; del mismo modo, el reactivo puede ser también preparado con las sustancias en forma seca para ser disueltas en agua a fin de obtener la solución de utilización.

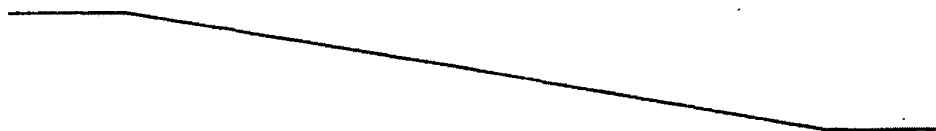
La alusión al fenol y a la 4-aminoantipirina es sólo una de las posibles combinaciones apropiadas para ser empleadas para la realización del método según la presente invención; muchas sustancias pueden sustituir a la 4-aminoantipirina y al fenol, siempre que se respeten las condiciones teóricas esenciales para que una sustancia pueda ser utilizada en el sistema.

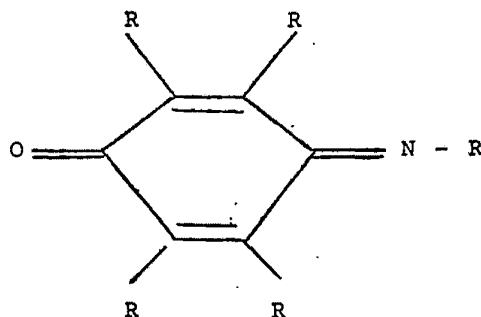
Sustituyentes del fenol pueden ser los fenoles que más adelante se definen, los naftoles que más adelante se definen, las hidroxiquinolininas e hidroxiquinoaldinas que más adelante se definen y otros compuestos que se definirán todavía más adelante.

También en lo que respecta a los sustituyentes de la 4-aminoantipirina se remite a las definiciones que se darán en el transcurso de la siguiente descripción.

Muchos fenoles pueden ser utilizados en el sistema red-ox terminal para obtener la estructura cromógena.

Tal estructura, con los fenoles, puede representarse esquemáticamente por la siguiente fórmula:

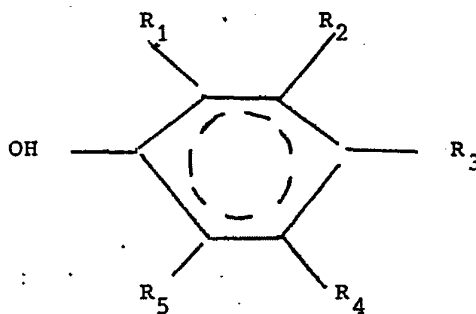




5

cuyos sustituyentes se definirán más adelante.

Ahora tomando la estructura del fenol como base e indicando con $R_1, 2, 3, 4, 5$ los varios grupos sustituyentes, puede establecerse un elenco, obviamente a título de ejemplo y en ningún modo limitativo de las posibilidades de la presente invención, de sustancias reactivas adoptables en el método aquí descrito:



15

(fenol: de R_1 a $R_5 = H$) según la siguiente

TABLA 1

COMPUESTO	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
fenol					
20 o.cresol	CH_3				
m.cresol		CH_3			
5-hidroxi-1,3-dimetilbenceno		CH_3		CH_3	
25 3-hidroxi-1,4-dimetilbenceno	CH_3			CH_3	

Cont. TABLA 1

	<u>COMPUESTO</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>	<u>R₅</u>
	timol		CH ₃			C ₃ H ₇
	carvacrol	CH ₃			C ₃ H ₇	
5	o.hidroxidifenilo	C ₆ H ₅				
	o.ciclohexilfenol	C ₆ H ₁₁				
	o.hidroxiaceto- fenona	COCH ₃				
10	2,4'-dihidroxi- benzofenona	COC ₆ H ₄ OH				
	2-cloro-5-hidroxi- tolueno		CH ₃	Cl		
	o.clorofenol	Cl				
	p.clorofenol			Cl		
15	2,4-diclorofenol	Cl		Cl		
	p.bromofenol			Br		
	2,6-dibromofenol	Br				Br
	2,4,6-tribromo- fenol	Br		Br		Br
20	guayacol	OCH ₃				
	resorcinol éter monometílico		OCH ₃			
	hidroquinona éter monometílico			OCH ₃		
25	guayacol sulfonato	OCH ₃				SO ₃ ⁻
	ácido o.fenol- sulfónico	SO ₃ H				
	ácido p.fenol- sulfónico			SO ₃ H		
30	ácido salicílico	COOH				
	ácido m.hidroxi- benzóico		COOH			

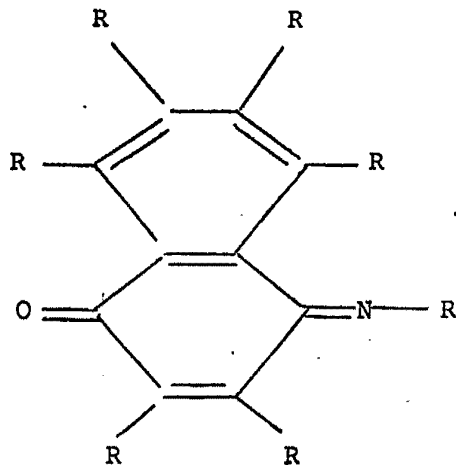
Cont. TABLA 1

	<u>COMPUESTO</u>	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>	<u>R₄</u>	<u>R₅</u>
	ácido p.hidroxi- benzóico			COOH		
5	metilo p.hidroxi- benzoato			COOCH ₃		
	metilo salicilato	COOCH ₃				
	fenilo salicilato (salol)	COOC ₆ H ₅				
10	ácido salicil- salicílico	COOC ₆ H ₄ CO ₂ H				
	salicilamida	COHH ₂				
	salicilaldehido	CHO				
15	ácido vainílico	OCH ₃		CHO		
	ácido 3,5 dibromo- -4-hidroxibenzóico	Br		COOH		Br
	catecol	OH				
	resorcinol		OH			
20	orcinol		OH		CH ₃	
	epinefrina	OH			NHCH ₃ CH ₂ CHOH	
	fluoroglucinol		OH		OH	
	pirogalol	OH	OH			
	m.aminofenol		NH ₂			

25 También numerosos naftoles pueden ser utilizados en el sistema red-ox terminal para obtener la estructura cromógena.

Tal estructura, con los naftoles, puede representarse esquemáticamente del siguiente modo, tomando como ejemplo el derivado del 1-naftol:

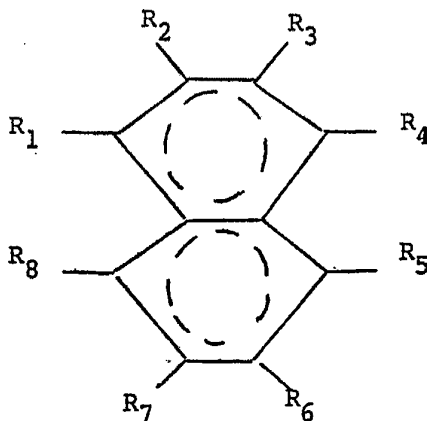
5



10

Tomando la estructura del naftaleno como base e
 indicando con $R_{1,2,3,4,5,6,7,8}$ varios grupos constituyentes,
 puede establecerse un elenco a título de ejemplo de sustan-
 cias reactivas más usuales, adoptables en el sistema
 reactivo en cuestión:

15



20

naftaleno (de R_1 a $R_8 = H$) según la siguiente Tabla II.

TABLA II

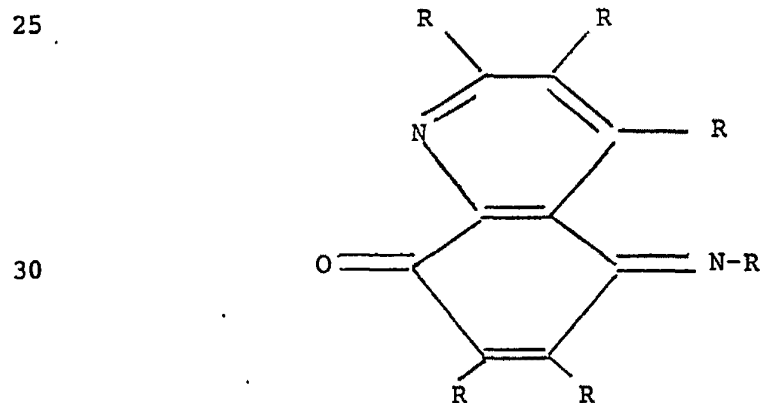
<u>COMPUESTO</u>	<u>R_1</u>	<u>R_2</u>	<u>R_3</u>	<u>R_4</u>	<u>R_5</u>	<u>R_6</u>	<u>R_7</u>	<u>R_8</u>
1- naftol	OH							
25 ácido L	OH				SO ₃ H			
ácido 1-naftol- -4-sulfónico	OH			SO ₃ H				

Cont. TABLA II

COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
ácido cromo- trópico	OH		SO ₃ H			SO ₃ H		OH
5 ácido H	OH		SO ₃ H			SO ₃ H		NH ₂
ácido 1-naftol- -7-amino-3- -sulfónico	OH		SO ₃ H				NH ₂	
2-naftol		OH						
10 ácido R		OH	SO ₃ H			SO ₃ H		
ácido G (sal bipotásica)		OH				SO ₃ K		SO ₃ ⁻ K
ácido de Schaeffer		OH				SO ₃ H		
15 ácido 3-hidroxi- -2-naftóico		OH	COOH					
3-hidroxi- -2-naftamida- -N-sustituída		OH	CONHR					

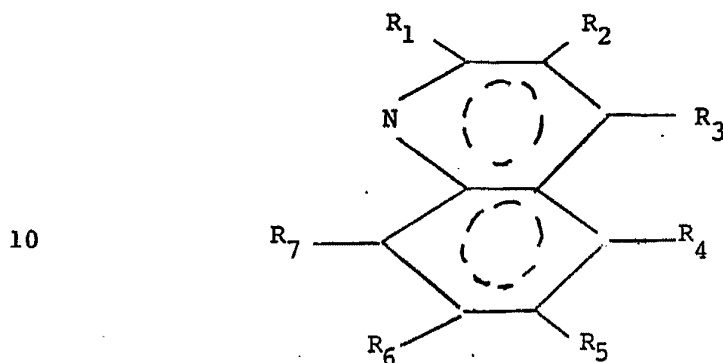
20 También compuestos del grupo de las hidroxiquinolinas e hidroxiquinaldinas pueden ser utilizados en el sistema red-ox terminal, para obtener la estructura cromógena.

Esta estructura, con estos compuestos, puede representarse esquemáticamente del siguiente modo:



(ejemplo derivado de la 8-hidroxiquinolina).

Tomando la estructura de la quinolina como base e indicando con $R_1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ varios grupos sustituyentes, puede establecerse un elenco a título de ejemplo de sustancias reactivas más usuales, adoptables en el sistema reactivo en cuestión:



quinolina (de R_1 a $R_7 = H$) según la siguiente

TABLA III

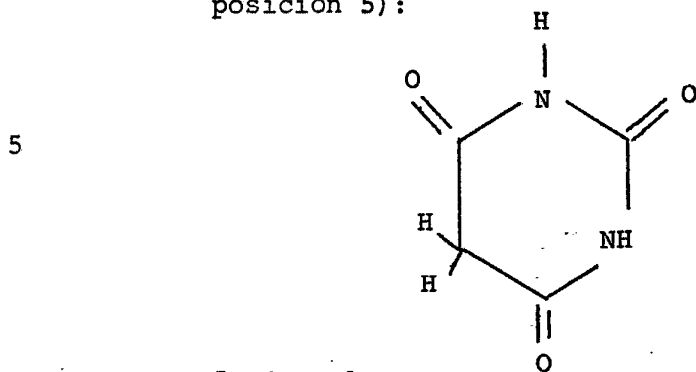
15

COMPUESTO	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
3-hidroxiquinolindina	CH_3	OH					
5-hidroxiquinolina				OH			
20 6-hidroxiquinolina					OH		
7-hidroxiquinolina						OH	
25 8-hidroxiquinolina							OH
7-metil-8-hidroxiquinolina						OH_3	OH
30 ácido 8-hidroxiquinolin-3-sulfónico				SO_3H			OH

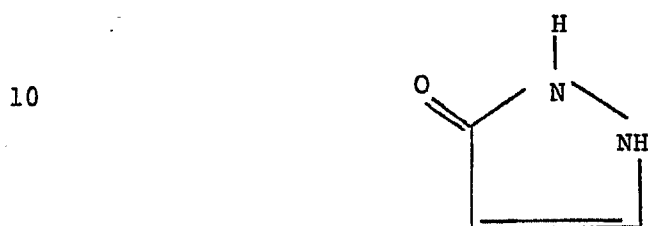
Además de los compuestos comprendidos en los grupos químicos ya mencionados, también pueden utilizarse - como sustituyentes del fenol - otros compuestos, de los cuales

un breve elenco a título de ejemplo es el siguiente:

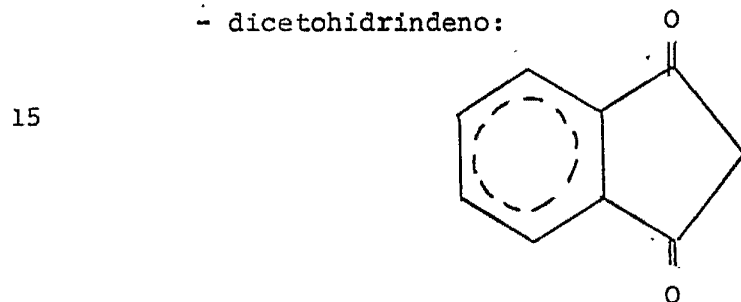
- ácido barbitúrico y derivados (no sustituidos en la posición 5):



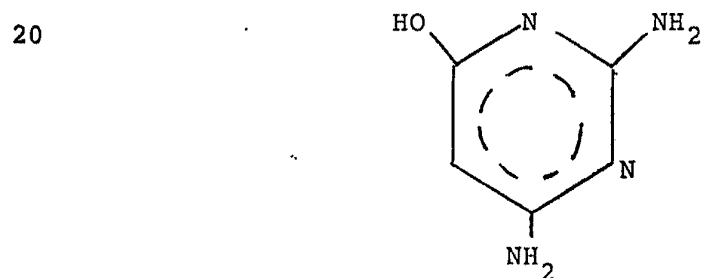
- 5-pirazolona:



- dicetohidrindeno:



- 2,4-diamino-6-hidroxipirimidina:



25 También la 4-aminoantipirina puede ser sustituida en el sistema reactivo por otros compuestos, si bien la misma ha

resultado ser la más eficiente y apta para la finalidad de la invención.

Entre los principales compuestos utilizables en el sistema en sustitución de la 4-aminoantipirina pueden citarse los siguientes:

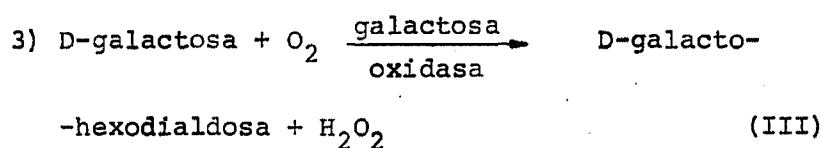
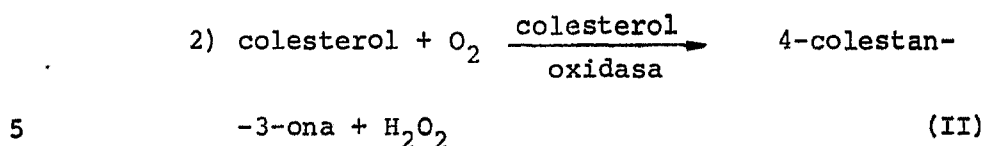
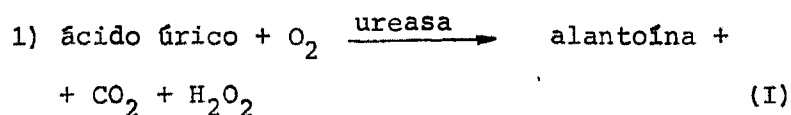
- aminofenazona: (4-dimetilamino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona);
- sulfamipirina: (ácido 2,3 -dimetil - 1 - fenil 5 pirazolona - 4 - aminometansulfónico sal Na);
- 10 - dibupireno: (ácido(1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolon-4-il)isobutilamino)metansulfonato sal Na);
- propilfenazona: (4-isopropil-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-3-ona);
- tozalinona: (2-dimetilamino-5-fenil-2-oxazolin-15 -4-ona);
- metampireno: (1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometansulfonato sódico).

Según se ha indicado, el peróxido que deba determinarse puede tener su origen en reacciones enzimáticas y/o puede formarse de reacciones químicas, o bien puede estar simplemente disponible, debiéndose determinar la cantidad del mismo.

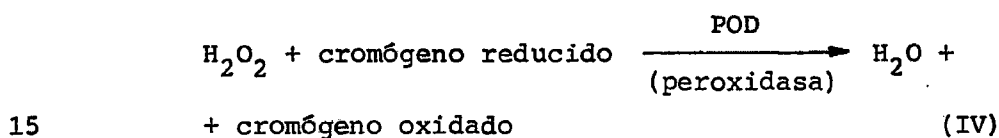
Así pues, en el caso particular del peróxido de hidrógeno, pueden presentarse los siguientes casos que, obviamente, deben entenderse solamente como ejemplos ilustrativos de la invención y no tienen en absoluto la finalidad de limitar el alcance de la misma.

EJEMPLO 1

H₂O₂ formado en reacciones enzimáticas:



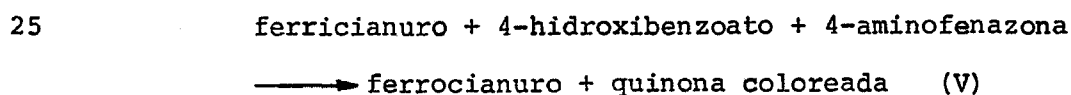
En todos los tres casos indicados, el peróxido de hidrógeno formado en la reacción está dosificado según la siguiente reacción general y común a todos los sistemas considerados:



N.B. - La POD es activa, además de sobre el peróxido de hidrógeno, también sobre el metilperóxido y el etilperóxido.

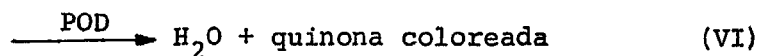
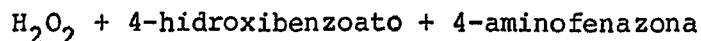
En cuanto al cromógeno pueden hacerse dos distinciones fundamentales:

a) Está constituido por una sustancia (ferrocianuro) que es oxidada (ferricianuro) y que, en esta forma, reacciona sucesivamente con otros componentes reactivos, sin intervención de enzimas:



b) Está constituido solamente por 4-hidroxibenzoato y 4-aminofenazona que reaccionan directamente en la

reacción catalizada por la POD (IV):



5 En ambos casos, el producto final determinable fotométricamente (la quinona) es idéntico.

En el caso a), la reacción se verifica en dos etapas y se precisarán dos reactivos diversos.

10 En el caso b), la reacción se verifica en una sola etapa y el reactivo puede ser uno solo, con simplificación del sistema. El uso del 4-hidroxibenzoato o de otro reactivo sólido con las características indicadas e ilustradas en las Tablas I, II, III, permitirá además la preparación del reactivo en polvo.

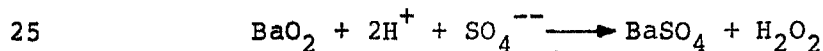
EJEMPLO 2

15 H_2O_2 formado en reacciones químicas o ya disponible para el dosificado:

1) El peróxido de hidrógeno está ya disponible en solución y se trata solamente de determinarlo. En este caso basta aplicar el sistema, según las reacciones IV y V ó VI, directamente a la solución en la que se desea efectuar el dosificado.

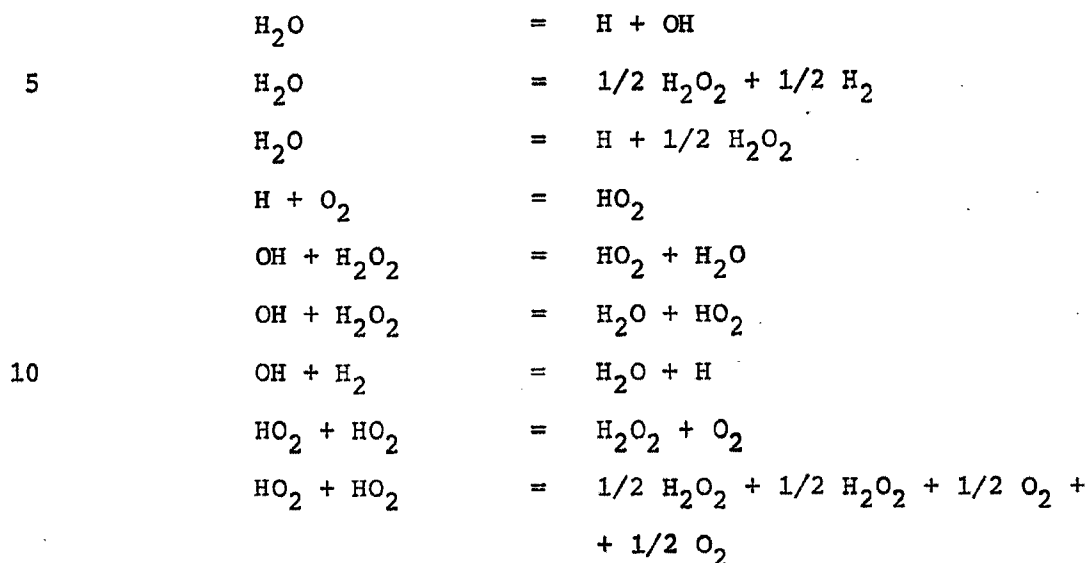
20

2) El peróxido es generado en reacciones químicas de tipo clásico; por ejemplo en aquellas utilizadas industrialmente para su producción:



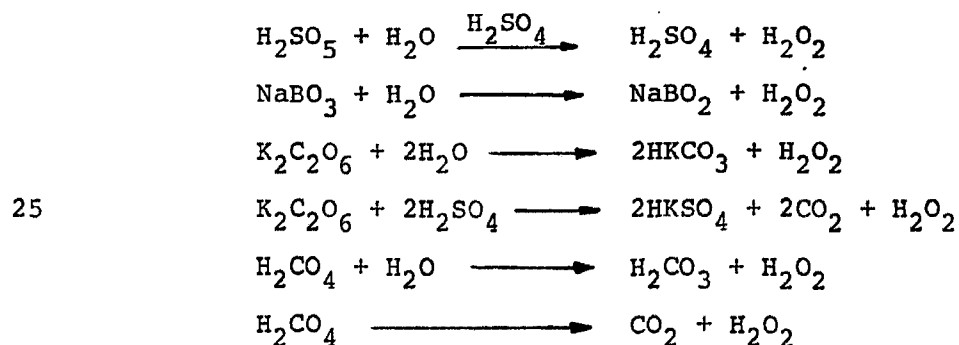
3) El peróxido es generado por acción de radiaciones ionizantes sobre el agua conteniendo oxígeno en solución (véase: Nouveau Traité de Chimie Minerales,

P. Pascal, Masson e Cie, ed., XIII, p. 542); las reacciones implicadas son numerosas y pueden ilustrarse esquemáticamente del siguiente modo:



4) El peróxido de hidrógeno puede encontrarse en el agua de lluvia o en la nieve (véase: Nouveau Traité de Chimie Minerale, P. Pascal, Masson e Cie., ed., XIII, p. 543).

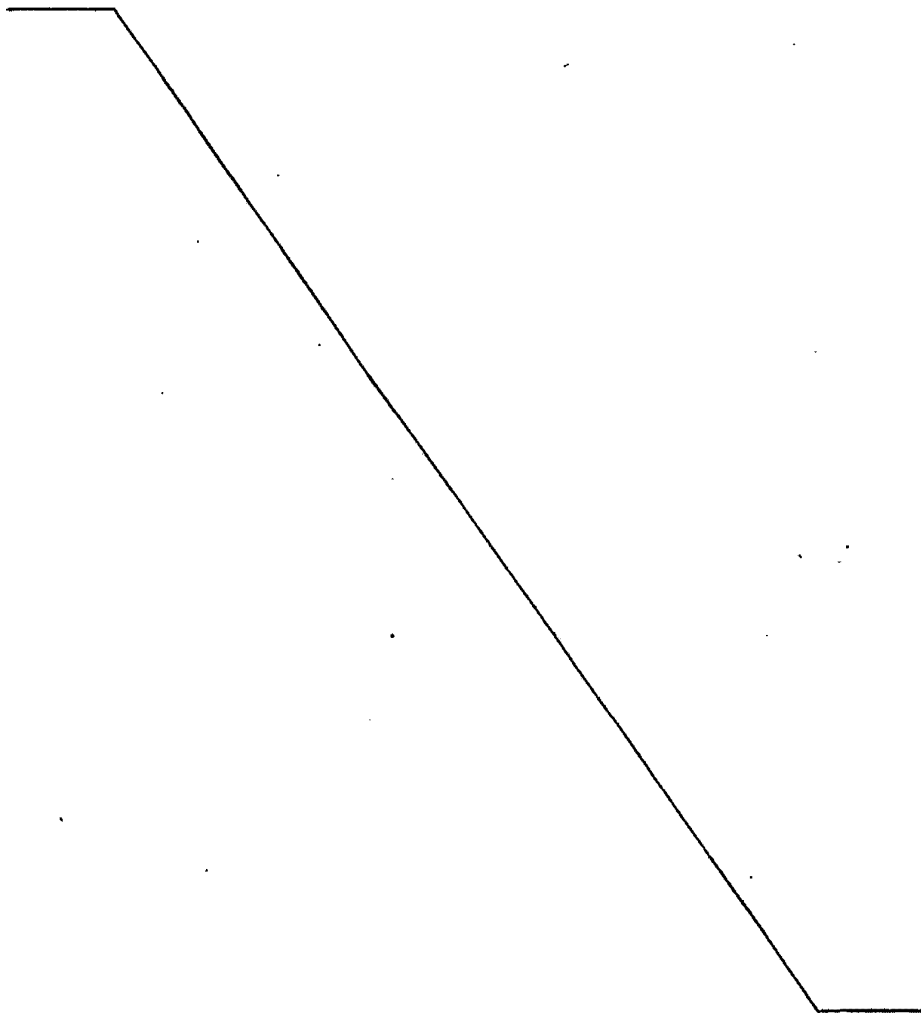
5) El peróxido de hidrógeno puede producirse, en ciertas condiciones, a partir de la descomposición de los persulfatos, perboratos, percarbonatos, según las siguientes reacciones:



Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así

como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle.

También se hace constar que esta invención corresponde
5 a la descrita en la Solicitud de Patente Nº 28040 A/76, depositada en Italia en 6 de Octubre de 1976, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y por lo que se solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que
10 queda resumido en las siguientes reivindicaciones:



REIVINDICACIONES

1^a.- Método para la determinación de peróxidos generados por reacciones enzimáticas y/o químicas, caracterizado porque se hace reaccionar el peróxido con un conjunto reactivo constituido por:

5

a) un componente conteniendo en la molécula al menos un anillo de carácter aromático con al menos un grupo -OH de tipo fenólico,

10

b) un componente con al menos un grupo reactivo ligado a una estructura derivada de la 1-fenil-5-pirazolinona.

2^a.- Método según la reivindicación 1^a, caracterizado porque dicha reacción del peróxido con el conjunto reactivo se efectúa a través de una reacción preliminar con un agente cromógeno.

15

3^a.- Método según la reivindicación 2^a, caracterizado porque como agente cromógeno se elige el ferrocianuro.

4^a.- METODO PARA LA DETERMINACION DE PEROXIDOS GENERADOS POR REACCIONES ENZIMATICAS Y/O QUIMICAS,

20

tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de diecisiete hojas mecanografiadas por una sola cara.

BARCELONA, 4 de Octubre de 1977.

Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno
Toscano "SCLAVO" S.p.A.
P.P.
J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO
p. p. Fdo. J. M. Valentín-Fernández

