



10 ES	11	486086	10 A1
21	22	FECHA DE PRESENTACION	
		1 NOV. 1979	

**PATENTE DE INVENCION**

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

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
141863/78	17 Noviembre 1978	JAPON

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C 25 B 7 / 00 // C 07 G 7 / 00	

54 TITULO DE LA INVENCION
"METODO Y CORRESPONDIENTE APARATO PARA LA ELECTRODEPOSICIÓN DE UNA PROTEINA EN UNA MEMBRANA DE INTERCAMBIO IÓNICO"

71 SOLICITANTE (S)
KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
TOKYO (Japón) 8 Horidome-cho 1-chome, Nihonbashi, Chuo-ku

72 INVENTOR (ES)
D. Teruo SAKAGAMI, D. Tadaaki KATO, D. Toru HIRAI y D. Naohiro MURAYAMA

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. Alfonso Durán Olivella

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un método para la electrodeposición de una proteína sobre una membrana de intercambio iónico mediante electroforesis, a partir de una solución en la que la proteína se ha disuelto o dispersado en suspensión y un aparato para dicha electrodeposición.

La técnica de efectuar el depósito de una sustancia de alto peso molecular cargada eléctricamente por electroforesis sobre un electrodo, es bien conocida en la técnica y se ha aplicado ampliamente en campos industriales tales como el pintado.

La ventaja de este método de depósito de capas reside en que la sustancia de elevado peso molecular es depositada electrostáticamente con un espesor relativamente uniforme sobre los electrodos de cualquier forma y que no son necesarias fases térmicas tales como evaporación para separar la sustancia cargada eléctricamente y el líquido en el cual se ha incluido dicha sustancia.

Sin embargo, por otra parte, puesto que la sustancia cargada eléctricamente es depositada directamente sobre los electrodos en el método antes mencionado, el cual es bien conocido en la técnica, hay inconvenientes tales como las reacciones simultáneas entre la sustancia cargada de alto peso molecular y los electrodos, reacciones entre la sustancia de alto peso molecular y varios gases generados por las reacciones simultáneas de electrólisis del agua. Especialmente, en casos en que el método

conocido antes mencionado se aplica en la separación de sustancias biológicas de alto peso molecular, dado que dichas sustancias son propensas a los efectos de oxidación, reducción, etc., se observa frecuentemente fenómenos

5. desfavorables de tipo químico tales como degeneración, deterioro, etc.

Además, en el caso en que el método conocido antes mencionado se aplica a la electrodeposición de sustancias biológicas de alto peso molecular tales como

10. proteínas, se observan frecuentemente los siguientes inconvenientes:

- 1/ En caso de efectuar la electrodeposición de la sustancia de alto peso molecular sobre la superficie de un electrodo, habitualmente se generan gases como oxígeno e hidrógeno debido a la electrolisis del agua sobre la superficie del electrodo y dichos gases persisten dentro del film de sustancias electrodepositada de alto peso molecular sobre la superficie del electrodo y como resultado, es frecuentemente imposible conseguir una lámina no esponjosa de la sustancia.
- 15.
- 20.

- 2/ Es necesario proporcionar una carga eléctrica apropiada a la sustancia de alto peso molecular para desplazar la sustancia hacia la superficie del electrodo por electroforesis y entre las condiciones para dicha fase el pH de la sustancia de alto peso molecular es especialmente importante.
- 25.

Sin embargo, hay muchos casos en que dicha condición no es necesariamente la más apropiada para el

depósito eléctrico de la sustancia de alto peso molecular a la superficie de los electrodos. En otras palabras, el sobrevoltaje del electrodo usualmente fluctua de forma amplia debido a las condiciones en las cuales se da una

5. carga apropiada a la sustancia de alto peso molecular, tal como pH, y por esta razón, hay muchos casos en los que es necesario un voltaje operativo elevado o, en ciertas circunstancias, el electrodo queda afectado,

- 3/ Incluso en los casos en que las condiciones
10. de electroforesis de una sustancia de alto peso molecular a la superficie del electrodo quedan satisfechas, puesto que al efectuar la electrodeposición de la sustancia de alto peso molecular, por ejemplo, una proteína soluble en agua, la proteína es depositada en la superficie del
15. electrodo en un estado en que contiene agua absorbida por la proteína, es frecuentemente imposible conseguir una capa electrodepositada de proteína de una elevada densidad acompañada de una apropiada deshidratación. Este fenómeno es debido a que las condiciones para la electroforesis y
20. las condiciones para deshidratación de la proteína son distintas y especialmente, que las dependencias de ambas condiciones con respecto al pH son diferentes unas de otras. Además, en el proceso de los métodos habituales de electrodeposición, es extremadamente difícil ajustar ambas
25. condiciones y

4/ De acuerdo con la construcción del electrodo utilizado para depósito eléctrico, hay casos en que la sustancia de alto peso molecular cargada, por ejemplo una

- proteína, y la superficie del electrodo, se interponen entre sí en el proceso de formación de la capa electrodepositada de alto peso molecular o puede ocurrir asimismo que la capa retiene los gases generados. Como resultado,
5. el voltaje operativo queda elevado drásticamente al pasar el tiempo, no solamente para reducir la recuperación de la proteína sino también para hacer la eliminación de la capa de proteína del electrodo suficientemente difícil y para perjudicar notablemente la calidad de la capa de
10. proteína depositada.

De acuerdo con ello, la finalidad de la presente invención es dar a conocer un método para la fabricación eficaz de un film homogéneo de proteína que no contenga burbujas, por un proceso de electrodeposición con utilización de electroforesis a partir de un líquido en el que la

15. proteína está disuelta o dispersada en suspensión.

Otra finalidad de la presente invención es ofrecer un método de acuerdo con el proceso antes mencionado de electrodeposición, para recuperar de manera efectiva la proteína.

20.

Una finalidad adicional de la presente invención es dar a conocer un aparato para llevar a cabo los métodos antes mencionados.

Los inventores han descubierto que en el caso en

25. que se efectúe el depósito eléctrico de una proteína, utilizando electroforesis, a partir de un líquido en el que la proteína queda disuelta o dispersada en suspensión, el objeto antes mencionado queda satisfecho por interpo-

- sición de una membrana de intercambio de iones entre el líquido antes mencionado y el electrodo y llevando la proteína de forma que no quede depositada sobre la superficie del electrodo sino sobre la membrana de intercambio de iones, habiéndose completado satisfactoriamente la presente invención.

A continuación se explica de modo detallado la presente invención:

EXPLICACION DE LOS DIBUJOS:

10. La figura 1 de los dibujos adjuntos es una figura explicativa que muestra un ejemplo del aparato para realizar el método de electrodeposición de acuerdo con la presente invención y de manera esquemática.

15. La figura 2 es una figura explicativa que muestra un ejemplo de la combinación de etapas múltiples del aparato de la figura 1; la figura 3 es una figura explicativa que muestra un ejemplo del aparato en el cual el método de electrodeposición según la presente invención es realizado de manera continua.

20. DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION:

25. La característica fundamental de la presente invención consiste en que como mínimo una membrana de intercambio iónico queda interpuesta entre el electrodo y el líquido que contiene una proteína que debe ser electrodepositada.

Es decir, en el caso en que la proteína que debe ser electrodepositada posee una carga eléctrica positiva y se desea desplazar la proteína cargada hacia el cátodo, la

membrana de intercambio iónico queda interpuesta entre el cátodo y el líquido que contiene la proteína cargada y la proteína es desplazada por electroforesis hacia el cátodo para ser electrodepositada sobre la superficie de la

5. membrana de intercambio iónico. Por otra parte, en el caso en que la proteína esté cargada negativamente y se desee desplazar proteína cargada hacia el ánodo, la membrana de intercambio iónico queda interpuesta, al contrario, entre el ánodo y el líquido que contiene la proteína

10. cargada negativamente antes mencionada. De acuerdo con ello, en cada caso, el electrodo que es antípoda del electrodo hacia el cual se desplaza la proteína, entra en contacto con el líquido que contiene la proteína.

A continuación, en el caso en que se utilicen

15. dos membranas de intercambio iónico, el líquido que contiene la proteína queda situado entre dichas membranas y puesto que en este caso los espacios existentes entre las membranas de intercambio iónico y los electrodos, es decir, la cámara anódica y la cámara catódica, deben

20. encontrarse en estado de conducción eléctrica, una solución electrolítica tal como una solución acuosa de un ácido inorgánico o una sustancia alcalina queda situada en dicho espacio.

La presente invención presenta la ventaja de que

25. las condiciones de electroforesis de la proteína y las condiciones de deshidratación de la proteína electrodepositada pueden ser controladas por el cambio de concentración del ácido inorgánico o de la sustancia alcalina en

cada una de las cámaras en relación con los valores de pH en la superficie de los electrodos y de la solución que contiene la proteína. Por ejemplo, en caso en que la proteína positivamente cargada dispersada en agua debe ser

5. depositada eléctricamente sobre la membrana de intercambio iónico en el lado del cátodo, el cátodo y la dispersión acuosa ácida de la proteína queda dividida con una membrana de intercambio iónico y la cámara catódica queda llena de una solución alcalina acuosa. En este caso, la proteína

10. cargada positivamente se desplaza por electroforesis hacia el lado catódico y se adhiere a la membrana de intercambio aniónico. Sin embargo, los iones  $\text{OH}^-$  de la solución alcalina acuosa de la cámara del cátodo son capaces de pasar de manera relativamente fácil dentro de

15. la membrana de intercambio aniónico para neutralizar la proteína cargada positivamente en la superficie de la membrana. En este caso, se hace posible ajustar las condiciones óptimas de manera fácil controlando la concentración de la proteína cargada, el pH de la dispersión

20. acuosa de la proteína cargada y de la solución acuosa alcalina, la intensidad de corriente, la capacidad de intercambio de la membrana de intercambio iónico, etc.

También en los casos antes mencionados, sin embargo, especialmente en el caso en que el pH de la

25. dispersión acuosa de la proteína está relativamente próximo a la neutralidad y la difusión de grandes cantidades de iones  $\text{OH}^-$  cambia la concentración de la sustancia alcalina en la cámara catódica, es preferible utilizar la membrana

de intercambio catiónico. A causa de la extrema reducción de la concentración de sustancia alcalina en el lado del catodo requerirá un elevado voltaje en la electrodeposición y por otra parte, el movimiento de los iones  $\text{OH}^-$  es

5. relativamente fácil con una concentración relativamente elevada de sustancia alcalina incluso a través de la membrana de intercambio catiónico.

Además, en el caso anterior, se observa la siguiente ventaja por la utilización de dos membranas de

10. intercambio iónico: la interposición de una membrana más de intercambio catiónico entre el ánodo y la dispersión acuosa de la proteína y el llenado con una solución acuosa de ácido clorhídrico del espacio situado entre la nueva membrana interpuesta y la cámara anódica, hacen posible el

15. evitar la elevación del pH de la dispersión acuosa de la proteína por la presencia de la membrana de intercambio catiónico y mantener el pH continuamente constante.

Si bien el material de la membrana de intercambio iónico utilizado en la presente invención no es especialmente crítico, la membrana puede comprender un esqueleto polímero altamente puenteadq, químicamente resistente, en el cual muchos grupos de intercambio aniónico y catiónico tales como grupos sulfonato, grupos carboxilato, grupos fenol, grupos amonio, etc., quedan fijados en forma

20. de substituyentes. Por ejemplo, la membrana comprende poli resina (ácido acrílico) puenteadada, poli resina (ácido metacrílico) puenteadada, (por ejemplo divinilbenceno, trivinilbenceno, etc. son los agentes de puente utilizados

25.

en estas resinas), copolímero sulfonado de estireno y divinilbenceno, homopolímero cuaternalizado y copolímero de divinilpiridina, etc.

- Además, la membrana que comprende resinas de
5. fluoropolímero especialmente resistentes a los agentes químicos se puede utilizar ventajosamente desde el punto de vista siguiente: habitualmente, la membrana que comprende la resina de fluoro polímero es muy fácilmente desmontable o separable de la capa de sustancia de alto
  10. peso molecular hidrófila, tal como proteínas, y la fuerte cohesión de la proteína al fluoropolímero raramente tiene lugar así como su mezcla.

- En cuanto a material para la membrana de intercambio iónico que comprende resinas de fluoropolímero, son
15. conocidos los que tienen grupo(s) sulfonados, grupo(s) carboxilados, grupo(s) fenólicos, etc. introducidos en el(los) homopolímero(s) o copolímero(s) de tetrafluoroetileno, clorotrifluoroetileno, trifluoroetileno, hexafluoropropileno, fluoruro de vinilideno,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -trifluoroé-
  20. tireno, etc. Entre las membranas de intercambio iónico que comprenden estas resinas de fluoropolímero una de las membranas preferibles es una membrana que comprende un copolímero de éter de perfluorovinilo y tetrafluoroeti-
  25. (Nafion, marca registrada, producto de la E.I. Du Pont de Nemours & Co. Inc.).

Además, como electrodo utilizado en la presente invención, son utilizables todos los electrodos habitual-

mente empleados para reacciones electroquímicas. Como material para el cátodo, por ejemplo, se puede utilizar el hierro, acero inoxidable, platino, etc. y en cuanto a material para el ánodo, titanio, carbono, platino, DSA

5. (titanio revestido de óxido de rutenio), etc.

- Estos electrodos y las membranas de intercambio iónico son utilizados después de su conformación a tamaños adecuados para la finalidad a que se destina. Por ejemplo, en el caso en que se debe fabricar una placa de film de
10. proteína, el tipo de placa para electrodos y membranas de intercambio iónico es adecuada. Para la finalidad de fabricar de manera continua un film cilíndrico de proteínas, los electrodos y las membranas de intercambio iónico deben ser de forma cilíndrica. Además, para la finalidad
15. de producir de manera continua un film de tipo plano, es preferible utilizar una membrana de intercambio iónico que posee la forma de un tambor giratorio.

- Los tipos de proteínas depositadas eléctricamente según la presente invención no quedan restringidos. Es
20. decir, no solamente las proteínas simples que liberen solamente aminoácidos en su hidrólisis sino también proteínas complejas tales como glicoproteínas y lipoproteínas que contienen otros compuestos orgánicos se pueden depositar eléctricamente por la presente invención. Además,
25. estas proteínas pueden ser aplicadas no solamente en cuanto a su solución acuosa sino también en forma de una dispersión acuosa en suspensión.

De acuerdo con ello, las proteínas eléctrica-

- mente depositables de acuerdo con la presente invención incluyen por ejemplo proteínas simples tales como ovoalbumina, lactalbumina, seroalbumina, leucosina, legumelina, ovoglobina, sero-globulina, lactoglobulina, glutenina,
5. prolamina, colágeno, elastina, queratina, fibroina, histoina y protamina, fosfoproteínas tales como caseína, vitelina y fosvitina, cromoproteínas tales como ferritina, hemocianina, hemoglobina y mioglobina, glicoproteínas tales como glucoproteína y mucoproteína, nucleoproteínas,
10. lipoproteínas, etc. Es especialmente interesante observar que un producto complejo formado por la reacción antígeno-anticuerpo en la sangre se puede depositar eléctricamente por el método de la presente invención. Es decir, el producto complejo antes mencionado formado en la sangre en vivo se puede electrodepositar de acuerdo con la presente
15. invención y luego se puede eliminar de la sangre y por lo tanto es posible esperar aplicaciones médicas de la presente invención.

- Además, cualesquiera mezclas de las proteínas antes mencionadas pueden ser depositadas eléctricamente de acuerdo con la presente invención.
- 20.

- Puesto que las proteínas antes mencionadas poseen en sus moléculas tanto los grupos disociables en forma ácida como los grupos disociables en forma básica,
25. se encuentran presentes en su solución como iones "zwitter" (iones con carga positiva y negativa). Es decir, puesto que la proteína lleva cargas eléctricas negativas en la gama de pH más alcalina que su punto isoeléctrico y lleva

cargas positivas en la gama de pH más ácida que su punto isoeléctrico, el pH de la solución acuosa de la proteína puede ser ajustado de acuerdo con los tipos de proteína que se deban depositar o de acuerdo con la opción del

5. electrodo. De manera general, la gama aproximada de pH adoptada en la presente invención va de 2,0 a 10,0. Las moléculas de proteína cargadas positivamente o negativamente que poseen un cierto valor de pH se desplazan hacia el cátodo o hacia el ánodo en la electroforesis o en la

10. aplicación de una corriente continua y llegan a la superficie de la membrana de intercambio iónico adoptada en la presente invención.

De manera general, la cantidad de agua absorbida por una proteína fluctúa ampliamente de acuerdo con el pH

15. y de acuerdo con ello, en el momento o punto de tiempo en que la molécula de proteína que llega a la superficie de la membrana de intercambio iónico se deposita sobre la membrana, es preferible que la cantidad de agua que ha sido absorbida por la proteína sea lo más reducida posible, es decir, el pH de la proteína se encuentra en una

20. gama en la cual la proteína está deshidratada. Especialmente, en el caso en que se tiene que producir un film especialmente homogéneo de la proteína, es necesario hacer que el pH de la superficie de la membrana de intercambio

25. iónico se encuentre en la gama antes mencionada. Para esta finalidad, es necesario ajustar el pH de la superficie de la membrana de intercambio iónico de acuerdo con el pH de la dispersión acuosa de la proteína.

Por ejemplo, en el caso en que se deposita una proteína cargada positivamente sobre la superficie de una membrana de intercambio iónico situada en el lado del cátodo, el grado de deshidratación de la proteína depositada se eleva al elevar el pH de la superficie de la membrana de intercambio iónico en el lado alcalino. Es decir, para elevar el grado de deshidratación es necesario elevar el pH de la superficie de la membrana de intercambio iónico más que el pH de la dispersión acuosa de la proteína y para esta finalidad la cámara del cátodo queda llena de una solución alcalina acuosa. Generalmente se utiliza para dicha finalidad una solución acuosa 0,1 a 5 N de hidróxido sódico.

Inversamente, en el caso en que una proteína cargada negativamente es depositada sobre la superficie de una membrana de intercambio iónico situada en lado del ánodo, el grado de deshidratación del film resultante de proteína se puede elevar al llenar la cámara anódica mediante una solución acuosa ácida.

Además, en la presente invención, es asimismo posible el depositar una proteína insolubilizada con respecto al agua, conseguida salando una proteína que ha sido disuelta en agua o una proteína conseguida ajustando el pH del espacio acuoso entre la membrana de intercambio iónico y un electrodo en una dispersión acuosa. Este proceso es utilizado cuando se requiere un film de proteína insoluble en agua a partir de una proteína soluble en agua.

A continuación se explica el aparato según el cual se realiza la invención de la presente invención y que hace referencia a los dibujos adjuntos.

- La figura 1 de los dibujos muestra un ejemplo de
5. una célula de electrodeposición dotada de dos films de intercambio iónico y en la figura 1, los numerales -1-, -2-, -3-, -4- y -4'-, -5-, -6- y -7- muestran respectivamente la célula, el ánodo, el cátodo, membranas de intercambio catiónico respectivamente, la cámara anódica formada por
  10. la membrana de intercambio catiónico -4'- en función de diafragma, la cámara de cátodos formada por otra membrana -4- de intercambio catiónico en función de diafragma y el espacio acuoso formado por las dos membranas antes mencionadas de intercambio catiónico -4- y -4'-. Además, en la
  15. cámara anódica -5-, queda situada una solución ácida inorgánica, por ejemplo, solución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 N y en la cámara de cátodos -6- queda dispuesta una solución acuosa alcalina, por ejemplo hidróxido sódico 0,2N.
  20. La cantidad de soluciones acuosas de electrolito, respectivamente en la cámara anódica -5- y en la cámara catódica -6- es ajustada respectivamente con respecto a la cantidad de dispersión acuosa de la proteína en el espacio -7-.
  25. En el funcionamiento de la célula de electrodeposición antes mencionada, en primer lugar, se introduce una dispersión acuosa de una proteína que se desea depositar, en el espacio -7-, y una solución acuosa de ácido

inorgánico así como una solución acuosa alcalina que se introducen respectivamente en la cámara anódica -5- y en la cámara catódica -6- y luego se aplica una corriente continua con un voltaje estacionario fijo.

5. En el caso antes mencionado, en el que el pH de la dispersión acuosa de la proteína es ajustado, por ejemplo, a 3,5 y por este procedimiento la dispersión acuosa es cargada positivamente, las moléculas de la proteína se desplazan por electroforesis hacia el cátodo y se depositan eléctricamente sobre la superficie de la membrana de intercambio catiónico -4- que es un diafragma que forma la cámara catódica -6-.

15. Además, es posible asimismo el proporcionar un agitador magnético en el fondo del espacio -7- antes mencionado de la celda -1- e introducir la dispersión acuosa de una proteína desde una entrada dispuesta en un extremo superior de uno de los lados del espacio -7-, de manera continua y con una proporción fija y depositar la proteína sobre la membrana de intercambio catiónico -4- con agitación y al mismo tiempo, descargar la dispersión acuosa agotada desde una salida prevista en un extremo superior de otro lado del espacio -7-. Además, en este caso, provocando la circulación de la solución acuosa de ácido inorgánico en la cámara anódica -5- y la solución acuosa alcalina en la cámara catódica -6-, respectivamente, y al mismo tiempo ajustando la cantidad o proporción de circulación para mantener la concentración del ácido y del álcali respectivamente constantes, la celda -1-mostrada a

título de ejemplo en la figura 1 puede funcionar de manera continua tal como se comprenderá de la explicación antes mencionada.

El aparato mostrado en la figura 2 ha sido

5. diseñado para el funcionamiento simultáneo y paralelo de la electrodeposición de proteína, preveyéndose en el mismo dos espacios para la introducción de la dispersión acuosa de la proteína. En la figura 2 los numerales -11-, -12- y -12'-, -13-, -14-, -15-, -16-, -17-, -18- y -18'-, -19-, 10. así como -20- y -20'-, muestran respectivamente, la célula, dos cátodos, un ánodo previsto en la parte central de la celda -1-, respectivamente las cuatro membranas de intercambio iónico del mismo tipo, dos cámaras catódicas respectivamente formadas por las membranas de intercambio 15. iónico -14- y -17- como diafragmas, la cámara anódica formada por las membranas de intercambio iónico -15- y -16- y respectivamente los espacios formados por las membranas de intercambio iónico -14- y -15- y -16-17-.

- El funcionamiento de la célula mostrada en la
20. figura 2 se puede llevar a cabo de la manera mostrada en la célula de la figura 1 y en el caso en que el pH de la dispersión acuosa de una proteína introducida en los espacios -20- y -20'- queda ajustado de manera que cargue la proteína negativamente, las moléculas de la proteína se 25. desplazan respectivamente hacia los ánodos en electroforesis y llegan a las membranas de intercambio iónico -15- y -16-. Es decir, en la celda mostrada en la figura 2, el depósito de la proteína se lleva a cabo en paralelo y de

acuerdo con ello, la cantidad de depósito por unidad de tiempo es dos veces la cantidad por unidad de tiempo que se puede conseguir en la célula mostrada en la figura 1, siendo iguales el resto de condiciones.

5. Además, el aparato mostrado en la figura 3 es un aparato especialmente adecuado para la producción continua del film de proteína, en el que los electrodos y las membranas de intercambio iónico están diseñadas en forma de tambor rotativo. En la figura 3, el numeral -111- es la
10. celda designada para sostener el tambor rotativo, -112- y -113- son el cátodo de forma semicilíndrica y el ánodo con estructura de tambor, respectivamente. Los numerales -114- y -115- muestran la membrana de intercambio iónico del tipo semicilíndrico o de semitambor y la membrana de
15. intercambio iónico con una estructura de tambor, respectivamente. El numeral -116- designa la cámara catódica formada por la pared interna de la celda -111- y el diafragma de la membrana de intercambio iónico -114-. Se designa con el numeral -117- la cámara anódica formada por
20. la membrana de intercambio iónico -115- en funciones de diafragma. Se designa con el numeral -118- el espacio formado por las dos membranas de intercambio iónico -114- y -115-, para mantener la dispersión acuosa de la proteína que debe ser depositada, en los que por un extremo de la
25. parte superior se prevé una entrada -21- y por otro extremo de la parte superior una salida -22- de la dispersión acuosa. En la figura 3 se muestra con el numeral -23- un colector dotado de una abertura de suministro de la so-

lución de electrolito acuoso hacia la cámara catódica y  
-24- muestra un eje rotativo, mostrando el numeral -25- un  
rascador para el film de proteínas que se ha depositado  
sobre la membrana de intercambio iónico -115-. Además, el  
5. eje rotativo antes mencionado queda realizado de forma  
tubular y queda diseñado de manera que la solución de  
electrolito acuoso fluye en ida y vuelta con respecto a la  
cámara anódica -117- a través del eje tubular.

El funcionamiento de la celda -111- tiene lugar  
10. del modo siguiente:

La dispersión acuosa de una proteína que debe  
ser depositada se introduce de manera continua en el  
espacio -118- mediante la entrada -21-, después de haber  
ajustado de forma que se haga negativa la carga de las  
15. moléculas de proteína y una solución acuosa alcalina es  
introducida en la cámara catódica -116- por medio de la  
entrada del colector -23- y es descargada por la salida  
del mismo colector -23- para constituir una circulación.  
Por otra parte, una solución acuosa de un ácido inorgánico  
20. es introducida en la cámara anódica -117- a través del eje  
rotativo -24- y es descargada de la cámara a través del  
propio eje -24-, logrando circulación. La membrana -115-  
de intercambio iónico de forma cilíndrica y el ánodo -113-  
de forma asimismo cilíndrica giran por la acción de un  
25. motor de régimen fijo conectado al eje rotativo -24-.

Al aplicar una corriente continua de voltaje  
fijo al aparato -111-, puesto que la proteína del espa-  
cio -118- está cargada negativamente, fluye por electrofo-

resis hacia el ánodo -113- y queda depositada sobre la superficie de la membrana -115- de intercambio iónico que ha sido situada en el lado del ánodo para formar un film de la proteína. De acuerdo con ello, por rascado del film

5. de proteína depositado en la membrana -115- mediante el rascador -25- dispuesto en un lugar apropiado, en la proximidad de la membrana, la lámina de proteína se puede producir de manera continua. Además, la dispersión acuosa agotada se descarga por medio de la salida prevista en el

10. otro extremo del espacio -118-.

Los aparatos mostrados anteriormente se han indicado solamente a título de ejemplo y el aparato para la realización de la presente invención no queda restringido a ninguna de las realizaciones anteriores, y además,

15. se debe comprender que son posibles varias modificaciones para la finalidad de la presente invención. Por ejemplo, es posible instalar un aparato en el cual los electrodos y las membranas de intercambio iónico quedan diseñadas y

20. posee los electrodos y las membranas de intercambio iónico diseñadas y construidas de forma cilíndrica.

La presente invención se explica de modo adicional haciendo referencia a los ejemplos no limitativos siguientes.

25. EJEMPLO 1:

Una pieza de carne de atún cortada con un peso de 20 gr. se homogeneizó con 500 ml de agua en un aparato mezclador y después de ajustar el pH del producto homogéneo

que comprendía principalmente una dispersión acuosa de mioproteína a 3,5, se filtró separadamente mediante (A) un medidor y (B) una lámina de papel de filtro y los dos tipos de filtrado transparente comprendían principalmente

5. una dispersión acuosa de mioproteína.

Los dos filtrados mencionados fueron designados dispersión acuosa de proteína para electrodeposición (A) y (B), respectivamente y se sometieron respectivamente a electrodepósito en el espacio -7- de una pequeña célula

10. -1- mostrada en la figura 1.

En la cámara catódica -6- de la célula -1-, se insertó un cátodo con un área efectiva de 4 cm x 9 cm realizado a base de rejilla de acero inoxidable, situándose en aquella una solución de hidróxido sódico acuosa 0,2 N.

15. Por otra parte, en la cámara anódica -5-, se insertó un ánodo con un área efectiva de 4 cm x 9 cm de DSA (titanio revestido de óxido de rutenio) y se situó una solución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 N. Como membranas -4- y -4'- de intercambio catiónico se utilizó Nafion (Marca registrada de la E.I. Du Pont de Nemours & Co. Inc.) # 110 de 10 milésimas de pulgada (0,254 mm) de espesor y con un área efectiva de 4 cm x 9 cm, siendo el material de la membrana una resina de fluoropolímero con grupos sulfonato suspendidos introducidos químicamente.

25. Las distancias entre la membrana de intercambio iónico -4- y el cátodo -3-, entre las dos membranas de intercambio iónico y entre la membrana -4'- de intercambio iónico y el ánodo -2- eran respectivamente y de modo

aproximado, 0,3 mm, 15 mm. y 0,3 mm. En cuanto a corriente eléctrica, se suministró corriente continua por un rectificador habitual conectado a una fuente de energía eléctrica estabilizada.

5. Al principio se llevó a cabo una prueba de electrodepósito con un voltaje fijo de 35 V. La fluctuación de la corriente se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

10.	Dispersión	Corriente (mA)		
		(A) o (B)	Inmediatamente después	Después de 2 minutos de inicio del electrodepósito
	(A)	aprox. 500	460	360
15.	(B)	aprox. 500	320	270

20. Pasados 5 minutos del inicio de la operación la corriente se redujo lentamente hasta un valor prácticamente constante comprendido entre 150 y 170 mA. Después de funcionar durante unos 10 minutos el proceso se detuvo para determinar el pH de la superficie del film depositado eléctricamente. Su valor fue de 4,7. La proteína de carne de atún depositada sobre la membrana -4- de intercambio catiónico alcanzó un espesor aproximado de 200  $\mu$  en el caso (A) y se pudo eliminar fácilmente de la membrana de intercambio iónico. Asimismo en el caso (B) fue de 150  $\mu$  en cuanto a espesor y asimismo se pudo eliminar fácilmente de la membrana. En estas láminas de proteína de atún no
- 25.

se presentan burbujas de manera que la proteína ha formado un film extremadamente homogéneo.

Ejemplo comparativo 1:

5. Usando la misma celda que en el ejemplo pero no utilizando las membranas de intercambio iónico -4- y -4'- y utilizando una placa de acero inoxidable de 4cm x 9 cm en función de cátodo y un DSA como ánodo, el electrodepósito de la misma proteína del ejemplo se llevó a cabo del modo siguiente:

10. Después de introducir la dispersión acuosa antes mencionada de proteína de atún (A) en el interior de la celda, se aplicó una corriente continua de 35 V durante 10 minutos a partir de una fuente de energía eléctrica estacionaria. En dicho momento la corriente mostró una reducción notable desde 210 mA hasta aproximadamente 10 mA. Si bien la placa catódica de acero inoxidable se recubrió con proteína de atún, la lámina así conseguida de proteína contenía tantas burbujas que la apariencia del film era grumosa.

20. Ejemplo comparativo 2:

25. Se llevó a cabo el electrodepósito de la proteína de atún del ejemplo 1 en la misma celda que en el ejemplo 1 si bien se utilizó Nafion<sup>®</sup> 110 como membrana -4'- de intercambio iónico y membrana de filtro Nuclipore (Marca registrada de la General Electric Co. con un diámetro de poros de valor 5) en funciones de membrana de intercambio iónico -4- y después de introducir la dispersión acuosa de proteína de atún (A) del ejemplo 1 en el espa-

5. cio -7- se dispusieron una solución acuosa de hidróxido  
sódico 0,2 N en la cámara catódica -6- y una solución  
acuosa de ácido clorhídrico 0,1 N en la cámara anódica -5-  
con una corriente continua de 35V. Después de 10 minutos  
de funcionamiento el pH de la superficie del film deposi-  
tado de proteína de atún tenía un valor de pH alto, aproxi-  
madamente 8 y la proteína de atún no estaba bien deshidra-  
tada y tenía un aspecto poco compacto.

10. De acuerdo con ello, se demostró que el control  
del electrodepósito de la proteína es difícil cuando se  
utiliza una membrana porosa como sustituto de la membrana  
de intercambio iónico. Además, la adherencia de la protef-  
na a la membrana porosa era tan fuerte que la eliminación  
completa del film de proteína de atún con respecto a la  
15. membrana porosa era extremadamente difícil.

EJEMPLO 2:

20. Se desengrasó bien la grasa de proteína colágeno  
obtenida a partir de pieles ("oxhides") y después de  
lavarla con agua se homogeneizó con agua que presentaba un  
pH de 3,3 durante 10 minutos, formando una dispersión  
homogénea acuosa de colágeno que contenía aproximadamente  
0,3% en peso de la proteína. La dispersión conseguida de  
este modo se introdujo en el espacio -7- de la celda del  
ejemplo 1 y se llevó a cabo el electrodepósito bajo las  
25. mismas condiciones que en el ejemplo 1 utilizando no  
obstante un voltaje de valor 20. La corriente fué inicial-  
mente de 150 mA, sin embargo, mostró una reducción con el  
transcurso del tiempo y llegó a ser aproximadamente de 50

mA después de 10 minutos de funcionamiento. El film de colágeno de la membrana -4- de intercambio iónico era extremadamente homogéneo en cuanto a su calidad y se deshidrató favorablemente sin contener (o incluir) cualesquiera burbujas. El film se podía eliminar fácilmente de la membrana.

Ejemplo comparativo 3:

La dispersión acuosa de proteína de colágeno utilizada en el ejemplo 2 se trató en la celda del ejemplo 1 sin utilizar, tal como en el ejemplo comparativo 2, membranas de intercambio iónico -4- y -4'- y utilizando una placa "Ferro" de 4 cm x 9 cm en función de cátodo y una placa de platino en función de ánodo. Si bien se aplicó inicialmente una corriente con tensión 20 V., puesto que la corriente mostró una rápida reducción desde 120 mA hasta unos pocos miliamperios, el voltaje se elevó a 35 V. Sin embargo, la corriente mostró nuevamente una reducción hasta aproximadamente 20 mA. El film de colágeno conseguido de esta manera lleva incluida una proporción importante de gas generada en los electrodos siendo tan poco estable que no se determinaron sus propiedades físicas.

EJEMPLO 3:

Utilizando la dispersión acuosa de aproximadamente 0,3% en peso de proteína colágeno obtenida en el ejemplo 2 como líquido para el depósito eléctrico y después de introducir el líquido en el espacio -7- de la celda de la figura 1 se llevó a cabo una operación de electrodeposición.

- sito en la que, no obstante, la membrana de intercambio iónico -4'- del lado anódico no se instaló en la celda. Después de llevar a cabo el depósito utilizando solamente una membrana -4- de intercambio iónico, el colágeno se
5. depositó en la membrana de intercambio iónico en forma de film homogéneo y bien deshidratado sin comprender burbuja alguna, casi en el mismo estado que en el ejemplo 2. Sin embargo, el pH de la dispersión acuosa agotada se elevó aproximadamente hasta 4,2.
10. EJEMPLO 4:
- Este ejemplo muestra el caso de electrodeposición continuo de proteína.
- La dispersión acuosa (A) de proteína de atún utilizada en el ejemplo 1 con un pH de 3,5 se introdujo de
15. manera continua con una velocidad de 280 ml/hora en el espacio -7- de la celda mostrada en la figura 1 desde una abertura en la superficie superior del espacio -7, agitando la parte inferior o baja del espacio y luego se descargó desde otra abertura en la parte opuesta de la superfi-
20. cie del espacio -7-. Los electrodos y la construcción de la celda eran los mismos que en el ejemplo 1. Se hizo circular una solución de hidróxido sódico 0,2 N en exceso en la cámara catódica -6-, para mantener la concentración del alcali en la solución acuosa de la cámara -6- continua-
25. mente con un valor 0,2 N. Asimismo en la cámara anódica -5- se hizo circular una solución acuosa de ácido clorhídrico 0,1 N en exceso, para mantener la concentración de ácido clorhídrico en la cámara -5- continuamente en el

valor 0,1N. Las membranas de intercambio iónico -4- y -4'- eran de Nafion N-110 tal como las utilizadas en el ejemplo 1.

- Al aplicar una corriente continua con un voltaje
5. estacionario de valor 35 a la celda, la corriente fué inicialmente de unos 500 mA, sin embargo; después de 2 minutos de funcionamiento, cuando la proteína se depositó gradualmente sobre la membrana -4- de intercambio iónico, la corriente se redujo hasta aproximadamente 400 mA. En
10. este momento, la parte superior de la lámina de proteína electrodepositada se separó de la membrana -4- y la parte separada del film se tiró continuamente hacia arriba para lograr de forma continua una lámina libre de proteína a una velocidad tal que la corriente se mantuvo en una
15. escala de 230 a 300 mA. El film conseguido de manera continua se lavó en agua con un pH de 7,0.

- El film conseguido de esta manera de proteína de atún tenía un espesor promedio de 120  $\mu$  en estado húmedo, sin incluir burbujas y tenía una calidad extremadamente
20. homogénea.

EJEMPLO 5:

- Se utilizó una solución acuosa al 2% en peso de ovo-albumina con un pH ajustado a 5,7 en un proceso de electrodepósito doble en la celda mostrada en la figura 2,
25. al mismo tiempo que se introducía la solución en los espacios -20- y -20'-, siendo los tipos de electrodos y de membranas de intercambio iónico utilizadas en este ejemplo y las distancias entre cada una de las membranas de inter-

- cambio iónico y cada uno de los electrodos y las existentes entre cada dos membranas de intercambio iónico, las mismas que en la celda utilizada en el ejemplo 1. Se situó una solución acuosa de hidróxido sódico 0,2 N en las
5. cámaras catódicas -18- y -18'- y una solución fisiológica salina se situó en la cámara anódica -19-, utilizando ambas en forma de soluciones electrolíticas. En funcionamiento se aplicó una corriente continua con un voltaje fijo de valor 35 entre el cátodo y el ánodo. Durante el
10. funcionamiento la corriente se elevó de 4 A a 6,5 A. La ovo-albúmina se depositó en las membranas de intercambio iónico -15- y -16- en forma de films casi homogéneos y en ninguno de los casos se observó contaminación alguna de burbujas. No existían aparentemente diferencias entre los
15. dos films conseguidos de esta forma. Después de acabar la operación, el valor del pH en las dispersiones acuosas agotadas era de 11,9 y 12,1, respectivamente, no mostrando diferencia notable alguna.

EJEMPLO 6:

20. Se situó una muestra de suero equino (Tipo #1, Pel-Freez Biologicals Inc.) con un valor ajustado de pH 10,0 en el espacio -7- de la celda utilizada en el ejemplo 1 y en la cámara catódica -6- de la celda se situó una solución de hidróxido sódico 0,2 N y en la cámara anódica
25. una solución fisiológica de agua. Después de aplicar una corriente continua con un voltaje estacionario de valor 20 durante 5 minutos se observó un film de suero equino sobre la membrana -4'- de intercambio iónico instalada en el

lado del ánodo. El film de proteínas conseguido de esta manera era homogéneo en cuanto a su calidad, sin incluir burbujas. El valor del pH del líquido acuoso agotado era de 11,5.

5. EJEMPLO 7:

- El suero equino utilizado en el ejemplo 6 se diluyó con 5 veces su volumen de agua desionizada y después de ajustar su pH a 7,5 se suministró de manera continua a la celda mostrada en la figura 3 desde la entrada -21- a la cámara -118-. En la cámara catódica se introdujo una solución acuosa de hidróxido sódico 0,2N desde una entrada dispuesta en el colector -23- y se hizo circular hacia una salida prevista asimismo en el mismo colector -23-. En la cámara anódica -117- una solución
10. acuosa salina fisiológica se introdujo a partir de una entrada tubular prevista en el eje rotativo -24- y se hizo circular descargándola por una salida tubular prevista asimismo en el eje -24-. El ánodo en forma de tambor -113- y la membrana de intercambio iónico -115- se hicieron
15. girar en sentido de las agujas del reloj por el eje rotativo -24- con una velocidad de 90 cm/hora.

- El radio de la membrana -115- de tipo de tambor rotatorio, para intercambio iónico, era de 5 cm y el área efectiva de la membrana era aproximadamente de 2 cm x 15
20. cm y el radio de curvatura de la membrana -114- de tipo fijo, de forma semitambor, para intercambio iónico, era de 6,5 cm.

Se aplicó una corriente continua con voltaje es-

tacionario de valor 20 al mismo tiempo que se trataba el líquido acuoso de 400 ml durante 1 hora para formar un film de gel de proteína de suero equino, depositada sobre la membrana -115- de intercambio iónico en forma de tambor rotativo. Después del raspado del film delgado así formado con el rascador -25- se consiguió un film homogéneo de proteína de suero equino. La corriente cambió de 2,2 A a 1,8 A durante el funcionamiento y el pH del líquido acuoso agotado estaba comprendido entre 10,5 y 11,0.

10. Todo cuanto no afecte, altere, cambie o modifique la esencia del método descrito, será variable a los efectos de la actual Patente.

N O T A

Se reivindica como objeto de esta Patente de invención:

1.- Método y correspondiente aparato para la  
5. electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, caracterizado porque dicha proteína disuelta o dispersa en suspensión en un líquido acuoso situado en un sistema de electrodepósito, en el cual por lo menos una membrana de intercambio iónico queda prevista  
10. entre los electrodos, es desplazada electroforéticamente y depositada sobre dicha membrana de intercambio iónico.

2.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 1, según el  
15. cual dicho sistema de electrodepósito comprende como mínimo dos cámaras formadas por membrana(s) de intercambio iónico en funciones de diafragma(s); una solución acuosa de un electrolito es suministrada hacia, como mínimo, una cámara de electrodo formada por dichos diafragmas y dicha  
20. proteína es desplazada electroforéticamente en una cámara adyacente a dicha cámara de electrodos.

3.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2, según el  
25. cual la cámara en la que dicha proteína es desplazada electroforéticamente, es la cámara de electrodos formada por el ánodo y una membrana de intercambio iónico.

4.- Método y correspondiente aparato para la

electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2, en el que la cámara en la cual dicha proteína es desplazada electroforéticamente es la cámara de electrodos constituida por el cátodo y una membrana de intercambio iónico.

5.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2, en el cual la cámara en que dicha proteína es desplazada electroforéticamente es la cámara formada entre dos membranas de intercambio iónico montadas entre los electrodos.

6.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2, en el que el pH de la superficie de dicha membrana de intercambio iónico es controlado formando una diferencia entre el pH de dicha solución acuosa del electrolito y el pH de dicha solución acuosa o suspensión de la mencionada proteína.

7.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 6, en el que el pH de dicha solución acuosa o suspensión de dicha proteína se encuentra comprendido entre 2,0 y 10,0.

8.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2 o reivindicación 6, en el que dicha solución acuosa del electrolito es una solución alcalina suponiendo que dicha pro-

teína esté cargada positivamente y dicha solución alcalina es suministrada hacia dicha cámara catódica con una concentración alcalina de 0,1 N a 5 N.

- 9.- Método y correspondiente aparato para la
5. electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 8, en el que dicha solución acuosa alcalina está constituida por una solución acuosa de hidróxido sódico.

- 10.- Método y correspondiente aparato para la
10. electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2 ó reivindicación 6, en el que dicha solución acuosa del electrolito es una solución acuosa de un ácido inorgánico, suponiendo que dicha proteína esté cargada negativamente y
15. dicha solución acuosa de un ácido inorgánico es suministrada a dicha cámara anódica con una concentración de dicho ácido inorgánico comprendida entre 0,1 y 5 N.

- 11.- Método y correspondiente aparato para la
20. electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha membrana de intercambio iónico está constituida por una substancia seleccionada del grupo que comprende fluoropolímeros, resina de ácido acrílico puenteada de forma intermolecular, resina de
25. ácido metacrílico puenteada de forma intermolecular, copolímeros de estireno sulfonado y divinilbenceno así como resina de vinilpiridina cuaternalizada dotada con, como mínimo, un grupo substituyente seleccionado del grupo

que comprende grupo sulfonato, grupo carboxilato y grupo fenol.

- 12.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha proteína es un miembro o una mezcla de más de dos miembros seleccionados del grupo que comprende ovo-proteína lacto-proteína sero-proteína, mio-proteína, proteína de semillas, escleroproteína, cromoproteína, fosfoproteína, glicoproteína, núcleo proteína y lipoproteína.

- 13.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 2, en el que el suministro de dicha solución acuosa del electrolito a dicha cámara de electrodos se lleva a cabo con circulación y la electroforesis de dicha proteína se lleva a cabo de modo continuo.

- 14.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según las reivindicaciones anteriores, en el que el aparato para su realización está caracterizado porque como mínimo una membrana de intercambio iónico queda situada entre el ánodo y el cátodo y dicho aparato está constituido como mínimo por dos cámaras formadas a partir de dichas membranas de intercambio iónico en funciones de diafragmas.

- 15.- Método y correspondiente aparato para la

electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 14, en el que como mínimo una cámara de electrodos formada por membranas de intercambio iónico en función de diafragmas queda constituida como cámara a partir de la cual es suministrada el electrolito líquido y una cámara adyacente a dicha cámara de electrodos queda constituida como cámara en la cual dicha proteína es desplazada electroforéticamente.

16.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 14, en el que dos membranas de intercambio iónico quedan instaladas entre dicho ánodo y dicho cátodo y una cámara formada entre las dos mencionadas membranas de intercambio iónico queda constituida en funciones de cámara en la cual dicha proteína es desplazada electroforéticamente y dicha cámara catódica y dicha cámara anódica, formadas respectivamente cada una de ellas por una membrana de intercambio iónico en función de diafragma, están constituidas respectivamente como las correspondientes cámaras desde las cuales es suministrada dicha solución de electrolito acuoso.

17.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según la reivindicación 16, en el que dos membranas de intercambio iónico están dispuestas respectivamente entre cada uno de dichos ánodos y cada uno de dichos cátodos habiéndose dispuesto en orden dichos ánodos y los mencionados cátodos.

- 18.- Método y correspondiente aparato para la electrodeposición de una proteína en una membrana de intercambio iónico, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que dicha cámara a partir de la cual
5. la mencionada solución acuosa de electrolito es suministrada, queda constituida para poder suministrar dicha solución de electrolito acuoso de manera circulante y dicha cámara en la cual la mencionada proteína es desplazada electroforéticamente queda constituida para poder
10. introducir dicha solución acuosa o suspensión de la mencionada proteína de manera continua.

- Sean cuales fueren las circunstancias que concurran en la esencialidad de la Patente de invención definida en las anteriores reivindicaciones, cuyo objeto
15. es:

19.- "METODO Y CORRESPONDIENTE APARATO PARA LA ELECTRODEPOSICIÓN DE UNA PROTEINA EN UNA MEMBRANA DE INTERCAMBIO IÓNICO".

- Consta la presente memoria de treinta y seis
20. hojas foliadas, mecanografiadas por una sola cara y de los dibujos unidos a la misma.

Barcelona, = 1 NOV. 1979

P.A. de KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA

ALFONSO DURÁN  
p. p.



Fdo.: Luis A. Durán Moya

FIG. 1

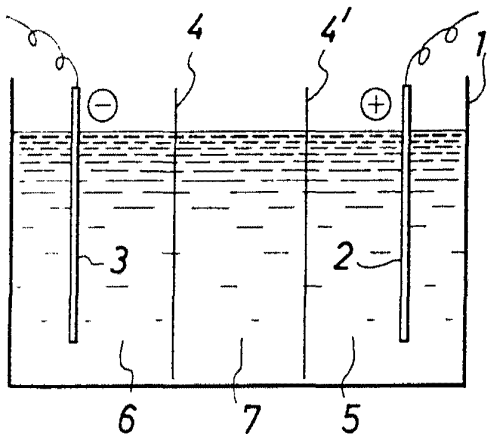


FIG. 2

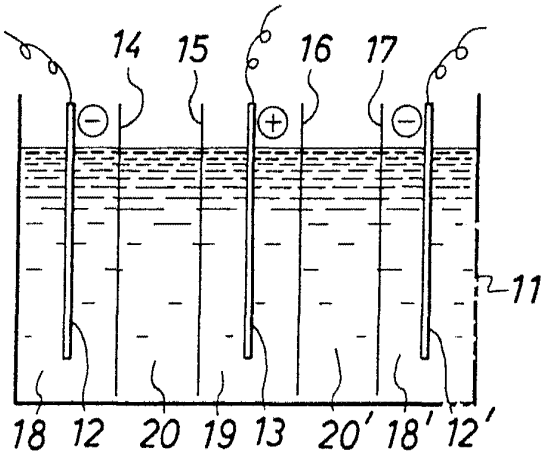
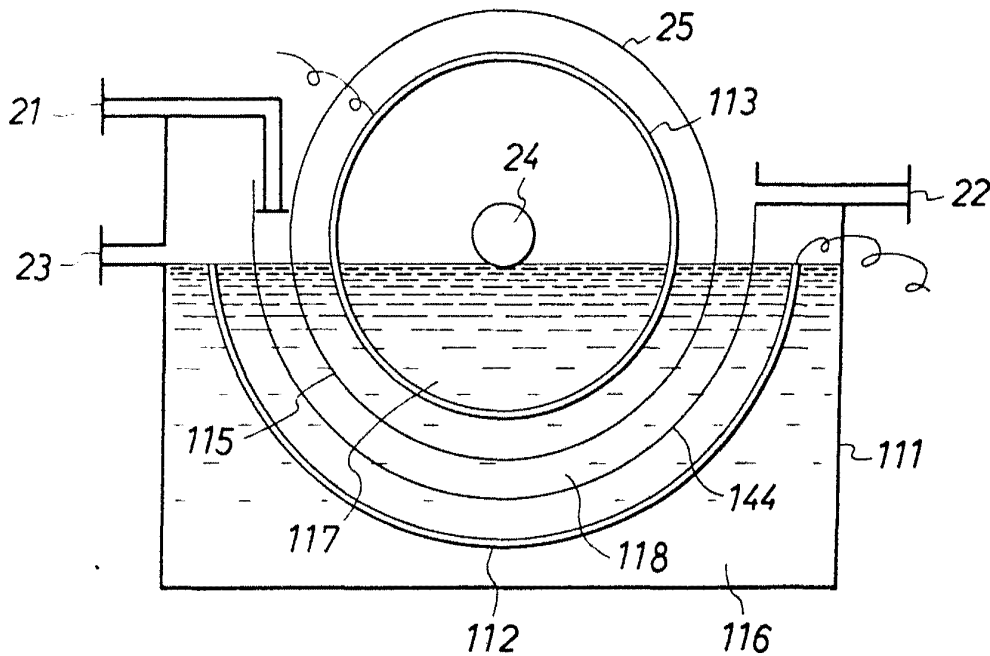


FIG. 3



BARCELONA, - 1 NOV. 1979  
PA.  
ALFONSO DURÁN  
P. P.

ESCALA VARIABLE

Edo. Luis A. Durán Moya