

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 173**

51 Int. Cl.:

G01N 1/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2011 E 11764613 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2705345**

54 Título: **Uso de halógeno-cianoacetamidas para la fijación y conservación de muestras biológicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2015

73 Titular/es:

LAPENNA, JOSÉ CARLOS (100.0%)
R. Padre Antonio Pacheco da Silva 431, Padre
Bento
13313-003 Itú, São Paulo, BR

72 Inventor/es:

GERIGK, ROBERTO

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 537 173 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de halógeno-cianoacetamidas para la fijación y conservación de muestras biológicas.

La presente invención versa sobre el uso de una solución que comprende una halógeno-acetamida o mezclas de la misma para fijar y conservar materiales biológicos, según se define en la reivindicación 1.

5 Con esto, la muestra queda intacta y fijada hasta un procesamiento ulterior, y las proteínas y otros componentes de la muestra no son fuertemente alterados por la solución, permitiendo la detección de factores bioquímicos que se destruirían en una solución fijadora convencional.

10 Para el formaldehído, el ácido crómico, el ácido ósmico y otros componentes acoplables, es normal la desnaturalización irreversible de las proteínas, que tiene una influencia decisiva en la composición de las proteínas de la muestra.

En la determinación bioquímica de las enzimas, las proteínas y los exámenes inmunológicos y otros específicos a las proteínas, no se pueden usar estas sustancias fijadoras convencionales.

Hasta el día de hoy, el formaldehído (formol) es la sustancia fijadora más usada, que tiene excelentes propiedades fijadoras incluso durante periodos de tiempo mayores.

15 Se considera que los aldehídos, especialmente el formaldehído, son sumamente tóxicos.

Fue clasificado justificadamente como un producto químico carcinógeno potencial y puede causar alergias e irritaciones dérmicas, respiratorias y oculares. En caso de exposición a dosis elevadas, puede resultar incluso en peligro de muerte. También tiene un olor picante y desagradable característico.

Por razones de protección medioambiental y de seguridad en el trabajo, el uso de formol está legalmente restringido.

20 Técnica anterior

Las soluciones fijadoras sin formaldehído son conocidas por las patentes EP 1 455 174 B1, US 6 531 317 B2, WO 03/029 783 A1, DE 699 17 779 T2, US 5 422 277 A, US 2005/0084924 A1 y DE 26 30 823 A1.

25 Hay varias ideas para crear una solución fijadora sin formaldehído, según se describe en el documento DE 38 22 183 A1, en el que se sugiere el ácido tánico como componente principal de la solución. Para obtener una fijación rápida, la patente DE 38 24 936 A1 sugiere la utilización de la acción del agua caliente, con la ayuda de ácido tánico y un alcohol en el agua. La patente DE 44 04 544 A1 rechaza por completo los medios químicos de fijación, tales como el formol, sugiriendo una desnaturalización de las proteínas de la muestra por la acción del calor mediante baños de agua caliente. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja de que las estructuras del material que se está fijando pueden sufrir cambios morfológicos. Las proteínas, por ejemplo, pueden coagularse. Por esta razón, este procedimiento no es adecuado para todos los tipos de materiales.

30 En la bibliografía se conocen otras soluciones fijadoras. Casi todas ellas, con pocas excepciones, contienen sustancias muy peligrosas y son un gran riesgo potencial a los seres vivos y al entorno.

Entre los más conocidos podemos incluir:

35 el fijador de Schaudinn (contiene sales de mercurio), SAF (contiene formaldehído), MIF (contiene formaldehído y sales de mercurio), ácido ósmico (es carcinógeno, tóxico y cáustico), ácido crómico (carcinógeno, tóxico y cáustico), FA (formaldehído y alcohol) y otros que se mencionan en la bibliografía.

40 En general, una solución fijadora debe mantener materiales biológicos tales como tejidos biológicos, células, agregaciones de células, virus, bacterias, parásitos, levaduras, heces y otros en un estado estable durante un periodo de tiempo relativamente largo tras la toma de la muestra. El estado original de la muestra inmediatamente después de la recogida debería ser fijado para un examen ulterior en el laboratorio (por ejemplo, un examen microscópico) para que pueda encontrarse el estado morfológico presente en la recogida de la muestra. Cabe destacar que debe conservarse la estructura morfológica de la muestra. No habrá ningún proceso químico, físico o microbiológico, ni proliferación de bacterias, levaduras ni procesos de fermentación o descomposición ni otros procesos de degradación que puedan afectar de manera adversa a la muestra.

45 En definitiva, la solución fijadora debería mantener cualquier tipo de material biológico en un estado estable adecuado para la preparación o fines analíticos.

Las ideas anteriormente descritas que representan el estado actual de la técnica están orientadas para evitar por completo el uso de formol, sustituyéndolo con una sustancia no tóxica o con sustancias menos peligrosas, aunque tengan en la medida de lo posible las mismas características que el formol.

- 5 La fijación se basa en diferentes mecanismos químicos, algunos de los cuales no están aún plenamente aclarados. Un mecanismo fundamental es lo que se denomina "entrecruzamiento". En este proceso, hay un enlace químico de la molécula en el fijador que puede ser de tipo covalente, una interacción de van der Waals o incluso iónico en una correspondiente posición en una molécula de proteína de una muestra. Es posible que haya diferentes tipos de enlace al mismo tiempo. Con el incremento de enlaces químicos en el material biológico hay un aumento en la estabilidad mecánica de las estructuras biológicas y, a la vez, se destruyen los microorganismos de la muestra.
- Hasta ahora, las soluciones fijadoras eran diseñadas para maximizar estos procesos. Con esto, siempre hay un exceso de sustancia fijadora en la solución, lo que no siempre es necesario ni tan siquiera conveniente. (Si hay exceso de sustancias tóxicas en el lugar de trabajo, habrá una reacción excesiva con la muestra).
- 10 Descripción detallada de la invención
- En la presente invención se usan halógeno-acetamidas para la fijación y la conservación de materiales biológicos. Las halógeno-acetamidas, *per se*, no son parte de la presente invención.
- 15 – Según normativas válidas (en este caso, las normativas de la Comunidad Europea), la solución no es peligrosa ni simplemente algo peligrosa para el usuario y el medioambiente. (En cualquier caso menos peligrosa que las soluciones de fijación tradicionales).
- No presenta otras formas de peligro (inflamabilidad, explosión, corrosión, acumulabilidad en el medioambiente o gran volatilidad).
- 20 – Reacciona moderadamente con la muestra y las proteínas de la muestra, sin causar tensión alguna en la estructura morfológica de la muestra ("contracción") y mantiene intactos más parámetros biológicos y bioquímicos que las soluciones tradicionales.
- 25 – No altera significativamente los procesos que tiene que sufrir la muestra tras la fijación (tales como reacciones no deseadas, evitación de su tinción y otros).
- Se eligieron dos sustancias básicas para producir el efecto deseado:
- halógeno-cianoacetamidas,
- 2,2-dibromo-2-cianoacetamida o 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamida o, abreviadamente, DBNPA.
- 30 Para simplificar, llamaremos a la mencionada sustancia DBNPA.
- Se eligieron estas sustancias debido a lo siguiente:
- Las halógeno-cianoacetamidas y la DBNPA tienen intensas propiedades biocidas e interrumpen por completo las actividades biológicas y microbiológicas de la muestra.
- 35 Debido a la estructura molecular de estas sustancias, puede ocurrir el efecto de entrecruzamiento porque estos átomos halógenos producen polarización molecular necesaria para la incidencia de interacciones de van der Waals entre la molécula del fijador y las moléculas de proteínas de la muestra, garantizando con ello la estabilización de la estructura y, así, la fijación. Debido a las intensas propiedades biocidas de la sustancia, puede aplicarse una concentración mínima, evitando excesos innecesarios. La actividad biológica de la muestra cesa rápidamente, evitando la degeneración microbiológica de la muestra.
- 40 La acción óptima de la solución ocurre con un pH ácido o en torno al punto neutral, pero, dependiendo de otros componentes de la solución y de los resultados deseados, puede requerirse el ajuste del pH a un intervalo de 3-9.
- La solución fijadora que se usa en la presente invención puede prepararse en forma líquida lista para su uso. Sin embargo, también es posible presentarla en forma concentrada que proporcione una solución lista para su uso tras la adición de un disolvente apropiado que, en el caso más simple, es agua. Este concentrado puede ser una
- 45 solución concentrada, una mezcla en polvo, un gel soluble, un comprimido, una cápsula soluble, un barniz soluble que cubra el recipiente con la solución u otra forma similar.
- Con esto pueden reducirse los costes de transporte, almacenamiento y envasado, además de otras ventajas de orden económico y de logística, ya que el disolvente —agua en la mayoría de los casos— puede ser añadido por el usuario en el destino final.
- 50 Un ejemplo concreto es una solución que use un 2% en peso de DBNPA, y otras sustancias, como un ácido adicional para ajustar el pH a ligeramente ácido. Pueden utilizarse ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como el ácido cítrico. A continuación, puede añadirse un humectante, tal como etilenglicol, glicerina, propilenglicol, sorbitol, eritritol o similares, que también hacen de mediadores de la fase lipídica de la muestra, facilitando su dispersión. Otro componente para ser añadido sería un tensioactivo iónico o aniónico, o una mezcla de ambos, para disminuir la

5 tensión superficial de la solución, mejorando las características de dispersión. De estas sustancias podemos enumerar el polietilenglicol etoxilado, los sorbatos etoxilados (comercialmente, TWEEN), el dodecil sulfato de sodio, el benceno sulfonato de sodio y otros sulfatos y sulfonatos alquílicos, así como productos comerciales de las series TRITON, ETHOMEEN y otras similares. Pueden aplicarse alcoholes grasos ($N > 8$), tales como los mono o los polialcoholes, lineales o ramificados, como adyuvantes de proceso y mediadores de los tensioactivos usados.

Para la mejora de la solución para fines de comercialización, se añadirán aromas y colorantes que no sean incompatibles con otros componentes.

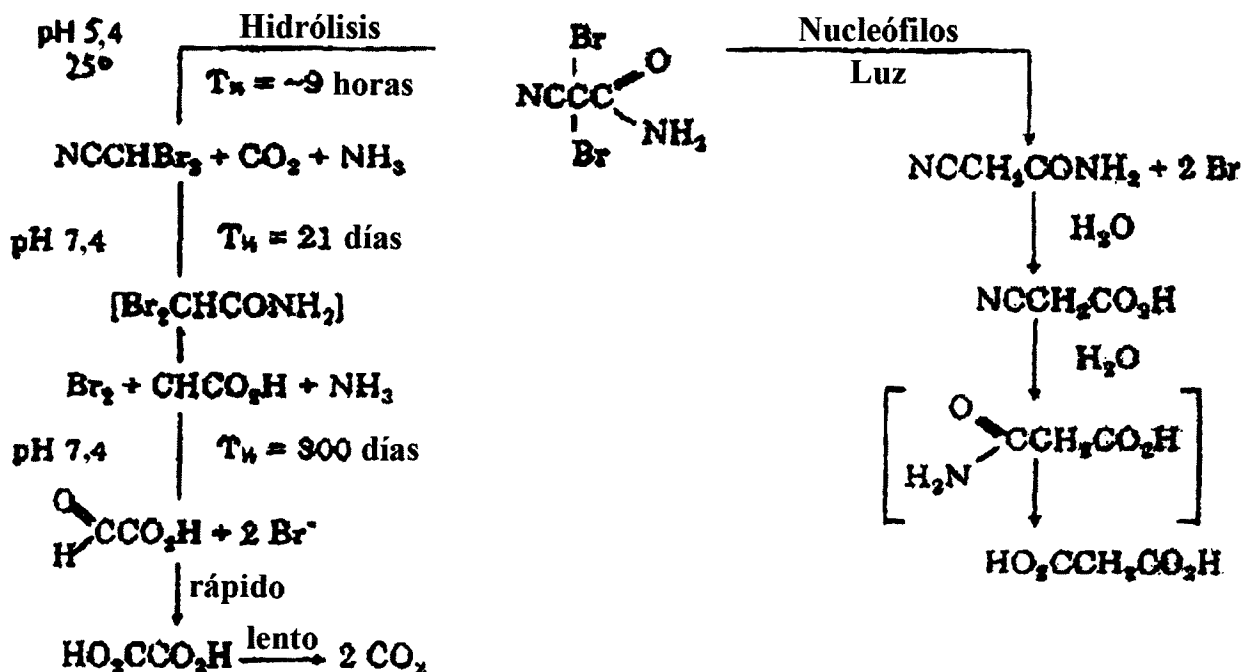
Con fines de ajuste isotónico, pueden añadirse sales de metales alcalinos y alcalino-térreos, tales como cloruros, sulfatos, nitratos, citratos, acetatos de litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, estroncio y otros.

10 Con fines de ajuste del pH en ciertas aplicaciones, puede ser necesaria la utilización de soluciones tampón tales como tampón de citrato, de acetato u otros conocidos en la bibliografía.

Aditivos de estabilización de la solución

15 Se sabe por la bibliografía que las halógeno-cianoacetamidas, especialmente la DBPNA, experimentan hidrólisis alcalina cuando se encuentran en solución. Para que la solución garantice un mayor periodo de operación, deberían añadirse pequeñas cantidades de antioxidantes específicos a la solución para evitar un deterioro precoz. La solución así tratada mantiene su actividad durante un periodo de aproximadamente dos años. La degradabilidad de la solución cuando se desecha no se ve afectada, manteniendo su característica ecológica.

Según puede verse en el siguiente diagrama, los productos finales de la descomposición de la DBPNA no son acumulativos en el medioambiente:



20 La fotodescomposición se demora con el uso de una tinción en la solución y siguiendo las recomendaciones de almacenamiento en un lugar oscuro y fresco.

La hidrólisis se reduce muchísimo con el uso de antioxidantes comerciales tales como 4,4-bis(2,6-di-terc-butilfenol) o 2,6-di-terc-butil-p-cresol o similares, lo cual se practica comercialmente.

25 Es importante subrayar que el formaldehído es uno de los productos de descomposición de la DBPNA, la cual es inhibida debido a la estabilización de los antioxidantes. Para los usuarios que necesiten que su muestra biológica quede fijada para un procesamiento que, por normativa, lleva solo unas semanas, la solución no presenta niveles de formaldehído que puedan afectar a la fijación moderada.

Las soluciones biocidas comerciales así estabilizadas de DBPNA usadas en la industria papelera y textil muestran una degradación de la DBPNA inferior al 10% en 20 meses, que garantiza una acción óptima del componente.

30 Ejemplo de formulación simple

DBPNA	2%
Propilenglicol	5%
TWEEN 80	1%
Colorante alimentario	0,01%
Mezcla de fragancias	0,01%
Antioxidante	0,05%
Agua hasta completar el 100%	

- 5 Esta solución fue sometida a ensayo y evaluada con muestras de heces humanas y animales desde el punto de vista parasitológico; se detectaron fundamentalmente huevos de parásitos. También se fijaron muestras histológicas de músculo bovino, mostrando una excelente calidad de fijación y conservación. Durante el periodo de observación de 30 días, no se observó ningún cambio en ninguna de las muestras analizadas. En una evaluación subsiguiente, se encontraron muestras de heces humanas contaminadas con protozoos. Se adjunta a este documento el informe de esta evaluación. Los protozoos en las heces son sumamente susceptibles de degradación y pueden degenerar en unas horas. En los ensayos se demostró una conservación y una fijación durante un periodo que superó los siete días. En comparación con una solución estándar de formaldehído, la calidad de conservación fue igual, si no mejor.

Ejemplo de formulación simple de un comprimido soluble

DBPNA	100 g
Sorbitol en polvo	41 g
TWEEN 80	2,5 g
Ácido cítrico	2,0 g
Colorante alimentario	1,0 g
Mezcla de fragancias	1,0 g
Antioxidante	2,5 g
Goma arábica	50 g
Masa total	200 g

- 10 Un comprimido de 40 g de esta masa contiene 20 g de DBPNA usados para producir una solución de 1 litro al 2% lista para su uso.

Al 2%, la concentración de DBPNA en la solución debería llevar únicamente a la frase de riesgo 43, que indica el riesgo de sensibilización a través del contacto con la piel. A concentraciones por debajo del 1%, la solución no precisa indicación de producto peligroso.

- 15 No es inflamable ni corrosiva, no produce emanaciones tóxicas ni peligrosas, no es teratógena ni carcinógena, no es perjudicial para el medioambiente y no requiere ninguna precaución especial para la seguridad en el trabajo, produciendo una extraordinaria mejora en la seguridad en el trabajo para el usuario, así como una notable simplificación en el proceso de gestión medioambiental en el laboratorio en el que esté siendo utilizada.

- 20 Debería señalarse aquí que, además de agua, pueden utilizarse otros disolventes, dependiendo de la aplicación deseada. Con los avances en las técnicas diagnósticas, se están estudiando el alcohol y otros disolventes tales como los de metilo, etilo, propilo, butilo, las cetonas, los ésteres, los éteres, la glicerina y otros compuestos orgánicos. El fijador descrito puede obtenerse con el uso de disolventes orgánicos y mezclas de disolventes orgánicos o mezclas de disolventes orgánicos con agua.

REIVINDICACIONES

1. El uso de una composición que comprende una o más halógeno-cianoacetamidas para la fijación de muestras biológicas.
2. El uso según la reivindicación 2 en el que la halógeno-acetamida es 2,2-dibromo-2-cianoacetamida.
- 5 3. El uso según las reivindicaciones 1 y 2 en el que la composición comprende un disolvente seleccionado de agua o de disolventes orgánicos o mezclas de los mismos.
4. El uso de una composición según las reivindicaciones 1, 2 y 3 que comprende, además, un regulador del pH.
5. El uso de una composición según la reivindicación 4 en el que el regulador del pH se selecciona del grupo: ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico y sus correspondientes sistemas tampón.
- 10 6. El uso de una composición según la reivindicación 4 que, además, comprende el ajuste del pH en un intervalo entre pH 3,0 y pH 6,0.
7. El uso de una composición según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 que, además, comprende:
 - un humectante,
- 15 – un tensioactivo,
 - una sal de metales alcalinos o alcalino-térreos, y
 - un antioxidante.
- 20 8. El uso de una composición según la reivindicación 7 en el que el humectante se selecciona del siguiente grupo de humectantes:
 - etilenglicol,
- 25 – propilenglicol,
 - glicerina,
 - eritritol,
- 30 – sorbitol y mezclas de los mismos.
9. El uso de una composición según la reivindicación 7 en el que el tensioactivo se selecciona de TWEEN 80 o de dodecil sulfato de sodio y mezclas de los mismos.
10. El uso de una composición según la reivindicación 7 en el que las sales alcalinas y alcalino-térreas se seleccionan del siguiente grupo:
- 35 citratos, acetatos, fosfatos, cloruros, sulfatos, formatos, nitratos, de litio, sodio, potasio, cesio, magnesio, calcio, estroncio y bario y mezclas de los mismos.
11. El uso de una composición según la reivindicación 7 en el que el antioxidante se selecciona del siguiente grupo:
 - 4,4-bis (2,6-di-terc-butilfenol),
- 40 – 4,4-bis (2,6-di-terc-butil-p-cresol) y mezclas de los mismos.
12. El uso de una composición concentrada según las reivindicaciones 1-7 en el que los componentes están presentes sin el disolvente en forma de polvo, comprimido, cápsula, gel o barniz o con poco disolvente en forma de concentrado para producir una solución lista para su uso añadiendo la cantidad requerida de disolvente.