

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 094**

51 Int. Cl.:

**C07B 63/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2011 E 11730572 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2585420**

54 Título: **Dispositivo y método para solubilizar, separar, eliminar y hacer reaccionar ácidos carboxílicos en aceites, grasas o soluciones acuosas u orgánicas por medio de micro- o nano-emulsificación**

30 Prioridad:

**28.06.2010 US 344311 P**  
**22.06.2010 EP 10075274**

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

**09.09.2016**

73 Titular/es:

**DIETZ, ULRICH (100.0%)**  
**Regerstrasse 1**  
**65193 Wiesbaden, DE**

72 Inventor/es:

**DIETZ, ULRICH**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 582 094 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

**Dispositivo y método para solubilizar, separar, eliminar y hacer reaccionar ácidos carboxílicos en aceites, grasas o soluciones acuosas u orgánicas por medio de micro- o nano-emulsificación.**

5

**A. Antecedentes de la invención**

10

La presente invención está dirigida a un método para solubilizar y eliminar ácidos carboxílicos y en especial ácidos grasos de aceites, grasas, emulsiones acuosas, soluciones acuosas u orgánicas. Se deberá utilizar además para fines analíticos, respectivamente diagnósticos de las concentraciones de ácidos grasos en los fluidos corporales de los sujetos, los alimentos o preparaciones farmacéuticas. Además, esta técnica deberá aplicarse para la eliminación de residuos de ácidos carboxílicos en soluciones industriales, por ejemplo, las que se producen en la industria de alimentos y el aceite.

15

20

En general, los ácidos grasos son moléculas altamente lipófilas que son apenas solubles en soluciones acuosas. Por lo tanto, sólo pequeñas concentraciones de ácidos grasos pueden ser solubilizadas en soluciones acuosas, mientras que todas las moléculas de ácidos grasos superiores a esta concentración están presentes en forma de micelas, forman una emulsión mediante la separación de fases o se absorben a las paredes del recipiente y/o otras moléculas lipófilas o anfílicas como las proteínas en la solución. Por encima de la concentración micelar crítica (CMC) de ácidos carboxílicos esterificados y no esterificados, la concentración de ácidos grasos libres en un medio acuoso se mantiene sin cambios.

25

Se conoce del estado de la técnica, que es posible la extracción líquido-líquido de miscela de aceite de oliva sulfurado en hexano con soluciones de etanol acuosas, de acuerdo con la divulgación de Selma Türkay et al. (J American Oil Chemist's Society, 1991, 68, 83-86): "Deacidification of Sulfur Olive Oil . I. Single-Stage Liquid-Liquid Extraction of Miscella with Ethyl Alcohol". La enseñanza de Türkay et al. divulga además condiciones de extracción óptimas para la recuperación de ácidos grasos libres con una menor pérdida de aceite neutro. De acuerdo con las condiciones divulgadas el porcentaje de ácidos grasos libres extraídos no se ve afectado por aumentar el contenido del ácido graso libre y glicéridos parciales de aceite de oliva sulfurado.

30

35

Además se divulga por Giovanni Bucolo et al. (Clinical Chemistry, 1973, 19, 476-482) in "Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the use of enzymes" un método para determinar los triglicéridos en suero en el que una hidrólisis enzimática reemplaza los procedimientos de saponificación más comúnmente usados. De acuerdo con el método divulgado, la hidrólisis enzimática puede completarse en menos de 10 minutos por la acción combinada de una lipasa microbiana y una proteasa. El ensayo divulgado es simple, rápido y requiere solamente 50µl o menos de muestra.

40

45

Los ácidos grasos tienden a formar emulsiones en medios acuosos. En presencia de proteínas o estructuras celulares, los ácidos grasos pueden ser absorbidos por ellas o se adsorben a ellos. La solubilización de dichos ácidos grasos inmovilizados depende principalmente de la concentración micelar crítica (CMC) del ácido graso en el medio acuoso circundante. Los emuladores y detergentes son capaces de aumentar la CMC de las sustancias hidrófobas y por lo tanto ayudar a separar las moléculas lipófilas inmovilizadas. Estos emuladores y detergentes pueden convertir las emulsiones en mini-, micro- o nano-emulsiones. Aquí el área de contacto de los ácidos grasos solubilizados con la fase acuosa se incrementa. Esto permite una mejor separabilidad y la extracción de los ácidos grasos solubilizados, así como también la reactividad con otras moléculas se ve aumentada.

50

55

Las emulsiones de ácidos grasos esterificados y no esterificados con un medio acuoso pueden separarse completamente sólo por medio de un solvente orgánico. Sin la ayuda de una membrana, esto sólo puede lograrse mediante la transferencia de los ácidos grasos a una fase orgánica a través de la mezcla con un solvente orgánico. La extracción es también posible por adsorción a un aceptor. En presencia de moléculas de adsorción, tales como proteínas, la separación de los ácidos grasos en una emulsión o suspensión por separación de fases o extracción a menudo es incompleta. Además, la capacidad de esta técnica es limitada y por lo general no es adecuada para el procesamiento en línea (continuo). Cuando se filtran tales emulsiones, la fracción acuosa se puede filtrar casi por completo. Sin embargo, también las moléculas hidrófilas, en particular las proteínas grandes, son retenidas y separadas junto con la fase orgánica. Una separación molecular se puede conseguir con métodos cromatográficos. Estos métodos, no obstante, requieren mucho tiempo y tienen una capacidad limitada.

60

65

Otro método para separar los ácidos carboxílicos de los medios acuosos u orgánicos es la destilación. Sin embargo, este procedimiento tiene una alta demanda de energía y podría generar la isomerización de los ácidos carboxílicos o desnaturalizar los componentes orgánicos en el medio. Un método adicional es la saponificación. Las sales añadidas son a menudo difíciles de eliminar de la solución orgánica, así como de la solución acuosa, durante el procesamiento posterior. Por lo tanto, hay una necesidad de una extracción continua y selectiva de ácidos grasos a partir de emulsiones de soluciones acuosas u orgánicas. El objetivo de la presente invención es proporcionar una separación sencilla, rápida y biocompatible de los ácidos grasos a partir de emulsiones acuosas o medios orgánicos.

5 Sorprendentemente, se ha descubierto que este objetivo se puede lograr mediante la adición de un compuesto de solubilización a la emulsión acuosa o medios acuosos, tal como sangre, medio lipófilo o medio orgánico que contiene los ácidos carboxílicos o mezclas de ácidos carboxílicos con otras moléculas organofílicas. Un compuesto de solubilización que tiene las características que aquí se definen es capaz de solubilizar los ácidos carboxílicos y convertir los ácidos carboxílicos emulsionados en micro- o nano-emulsiones que permiten una separación por medio de métodos de separación tales como diálisis, filtración y electroforesis.

10 De este modo, la tarea se resuelve mediante las enseñanzas técnicas subsiguientes de la reivindicación independiente de la presente invención. Otras realizaciones ventajosas de la invención resultan de las reivindicaciones dependientes, la descripción y los ejemplos.

### Ácidos grasos

15 En general, los ácidos grasos tienen un grupo de cabeza carboxílica y una cadena alifática larga. Dependiendo de la presencia de dobles enlaces, se diferencian en ácidos grasos saturados e insaturados. Existen diferentes definiciones en la literatura sobre los ácidos grasos. Una definición establece que los ácidos carboxílicos con 4 átomos de carbono o más son considerados como ácidos grasos. Los ácidos grasos naturales, no obstante, tienen por lo menos 8 átomos de carbono. En estos átomos de carbono, por lo menos un grupo nitro puede reemplazar los átomos de hidrógeno y convertirlos en ácidos nitro-grasos. También, los ácidos nitro-grasos pueden llevar sustituyentes adicionales, como se indica arriba.

20 Ejemplos de ácidos grasos lineales saturados son el ácido octanoico (ácido caprílico), ácido decanoico (ácido caprílico), ácido dodecanoico (ácido láurico), ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido hexadecanoico (ácido palmítico), ácido heptadecanoico (ácido margárico), ácido octadecanoico (ácido esteárico), ácido eicosanoico (ácido araquídico), ácido docosanoico (ácido behénico) y ácido tetracosanoico (ácido lignocérico). Según la invención, un subgrupo preferido de los ácidos grasos saturados que se van a separar son el ácido mirístico, el ácido palmítico y el ácido esteárico.

30 Ejemplos de ácidos grasos monoolefínicos son el ácido cis-9-tetradecenoico (ácido miristoleico), ácido cis-9-hexadecenoico (ácido palmitoleico), ácido cis-6-hexadecenoico (ácido salpénico), ácido cis-6-octadecenoico (ácido petroselinico), ácido cis-9-octadecenoico (ácido oleico), ácido cis-11-octadecenoico (ácido vaccénico), ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico (ácido ricinoleico), ácido cis-9-eicosenoico (ácido gadoleinico), ácido cis-11-eicosenoico (ácido gondoico), ácido cis-13-docosenoico (ácido erúxico), ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico), ácido t9-octadecenoico (ácido elaidico), ácido t11-octadecenoico (ácido t-vaccénico) y ácido t3-hexadecenoico. Según la invención, un subgrupo preferido de los ácidos grasos insaturados que se va a separar son trans-isómeros del ácido t9-octadecenoico, el ácido t11-octadecenoico y el ácido t3-hexadecenoico.

40 Ejemplos de ácidos grasos poliolefínicos son el ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido 6,9,12-octadecatrienoico ( $\gamma$ -linoleico), ácido 8,11,14-eicosatrienoico (ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico), ácido 5,8,11,14-eicosatrienoico (ácido araquidónico), ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico, ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico ( $\alpha$ -linoléico), ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico (ácido estearidónico), ácido 8,11,14,17-eicosatetraenoico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA), ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), ácido 5,8,11-eicosatrienoico (ácido aguamiel), ácido 9c 11t 13t eleostearinoico, ácido 8t 10t 12c caléndico, ácido 9c 11t 13c catálpico, ácido 4, 7, 9, 11, 13, 16, 19 docosaheptadecanoico (ácido estela-heptanoico), ácido taxólico, ácido pinolénico y ácido esciadónico. Según la invención, un subgrupo preferido de los ácidos grasos insaturados que se van a separar son los trans-isómeros del ácido linoleico,  $\gamma$ -linoleico, EPA y DPA.

50 Ejemplos de ácidos grasos acetilénicos son el ácido 6-octadecinoico (ácido tarírico), ácido t11-octadecen-9-inoico (ácido santálico o ximénico), ácido 9-octadecinoico (ácido estearólico), ácido 6-octadecen-9-inoico (ácido 6,9-octadeceninoico), ácido t10-heptadecen-8-inoico (ácido pirúlico), ácido 9-octadecen-12-inoico (ácido crepénico), ácido t7,t11-octadecadiene-9-inoico (ácido heistérico), ácido t8,t10-octadecadiene-12-inoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA).

55 Se debe observar que, de acuerdo con la invención, también las bases, respectivamente sales de los ácidos grasos mencionados anteriormente, se deberán integrar en los términos generales de ácidos grasos o ácidos grasos libres.

60 Ejemplos de bases orgánicas e inorgánicas adecuadas para la formación de sales son bases derivadas de los iones metálicos, por ejemplo, aluminio, iones de metales alcalinos, tales como sodio o potasio, iones de metales alcalinotérreos tales como calcio o magnesio o un ion de sal de amina o hidróxidos alcali- o alcalino-térreos, carbonatos o bicarbonatos. Los ejemplos incluyen hidróxido sódico acuoso, hidróxido de litio, carbonato de potasio, bicarbonato de amonio y de sodio, sales de amonio, aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como, por ejemplo, alquilaminas inferiores tales como metilamina, t-butilamina, procaína, etanolamina, arilalquilaminas tales como dibencilamina y N,N-dibenciletilendiamina, alquilpiperidinas inferiores tales como N-etilpiperidina, cicloalquilaminas tales como

ciclohexilamina o diciticlohexilamina, morfolina, glucamina, N-metil-y N,N-dimetilglucamina, 1-adamantilamina, benzatina o sales derivadas de aminoácidos como lisina, ornitina o de amidas de aminoácidos originalmente neutros o ácidos o similares.

5 Los siguientes ácidos carboxílicos son ejemplos preferidos de ácidos grasos:

10 ácido octanoico (ácido caprílico), ácido decanoico (ácido cáprico), ácido dodecanoico (ácido láurico), ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido hexadecanoico (ácido palmítico), ácido heptadecanoico (ácido margárico), ácido octadecanoico (ácido esteárico), ácido eicosanoico (ácido araquídico), ácido docosanoico (ácido behénico), ácido tetracosanoico (ácido lignocérico), ácido cis-9-tetradecenoico (ácido miristoleico), ácido cis-9-hexadecenoico (ácido palmitoleico), ácido cis-6-octadecenoico (ácido petroselinico), ácido cis-9-octadecenoico (ácido oleico), ácido cis-11-octadecenoico (ácido vaccénico), ácido cis-9-eicosenoico (ácido gadoleico), ácido cis-11-eicosenoico (ácido gondoico), ácido cis-13 -docosenoico (ácido erúxico), ácido cis-15-tetracosenoico (ácido nervónico), ácido t9-octadecenoico (ácido elaidico), ácido t11-octadecenoico (ácido t-vaccénico), ácido t3-hexadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido 6,9,12-octadecatrienoico (ácido  $\gamma$ -linoleico), ácido 8,11,14-eicosatrienoico (ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico), ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico), ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico, ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico ( $\gamma$ -linoleico), ácido 6,9,12,15-octadecatetraenoico (ácido estearidónico), ácido 8,11,14,17-eicosatetraenoico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA), ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), ácido 5,8,11-eicosatrienoico (ácido aguamiel), ácido 9c 11t 13t eleosteárico, ácido 10t 8t 12c caléndico, ácido 9c 13c 11t catálpico, ácido 4, 7, 9, 11, 13, 16, 19 docosaheptadecanoico (ácido estela-heptanoico), ácido taxoleico, ácido pinolénico, ácido esciadónico, ácido 6-octadecinoico (ácido tarférico), ácido t11-octadecen-9-inoico (ácido santálbico o ximenínico) , ácido 9-octadecinoico (ácido estearólico), ácido 6-octadecen-9-inoico (ácido 6,9-octadeceninoico), ácido t10-heptadecen-8-inoico (ácido pirúlico), ácido 9-octadecen-12-inoico (ácido crepenínico), ácido t7,t11-octadecadiene-9-inoico (ácido heistérico), ácido T8,T10-octadecadiene-12-inoico, ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ETYA), ácido eleosteárico, ácido caléndico, ácido catálpico, ácido estela-heptanoico, ácido taxoleico, ácido retinoico, ácido isopalmítico, ácido pristánico, ácido fitánico, ácido 11,12-metileno-octadecanoico, ácido 9,10-metileno-hexadecanoico, ácido coronárico, ácido (R,S)-lipoico, ácido (S)-lipoico, ácido (R)-lipoico, ácido 6,8-bis(metilsulfanil)-octanoico, ácido 4,6-bis(metilsulfanil)-hexanoico, ácido 2,4-bis(metilsulfanil)-butanoico, ácido 1,2-ditiolano carboxílico, ácido (R,S)-6,8-ditiano octanoico, ácido (R)-6,8-ditiano octanoico, ácido (S)-6,8-ditiano octanoico, ácido cerebrónico, ácido hidroxinervónico, ácido ricinoleico, ácido lesquerólico, ácido brasílico y ácido tápsico.

### 35 Ácidos grasos en la sangre

40 En los mamíferos, los ácidos grasos sirven como sustratos energéticos fisiológicamente importantes y juegan un papel crítico en el metabolismo energético. Además, son sustratos importantes para la síntesis de fosfolípidos de membrana y agentes biológicamente activos tales como los eicosanoides y leucotrienos. El cuerpo de los mamíferos depende fuertemente de los ácidos grasos como proveedores de energía almacenada químicamente, bloques de construcción de las membranas celulares y transductores de señales. La principal fuente de los ácidos grasos es los lípidos de la dieta, digeridos en el tracto gastrointestinal por la acción catalítica de las enzimas hidrolíticas pancreáticas. Parte de los ácidos grasos es producida por el hígado que toma los carbohidratos como sustrato. Un gran porcentaje de los ácidos grasos, no obstante, se almacena en las células grasas (adipocitos) que componen el tejido adiposo en forma de triglicéridos.

45 La concentración de ácidos grasos esterificados y no esterificados en la sangre depende de varios factores tales como la ingesta de alimentos o la liberación de tejido adiposo. Los ácidos grasos se pueden enlazar o ligar a otras moléculas, tales como los triglicéridos o fosfolípidos, o a un porcentaje menor de ácidos grasos que se encuentran no ligados. En cualquier caso, los ácidos grasos son insolubles en agua y debe estar ligado a una componente soluble en agua para el transporte en el organismo. Los ácidos grasos son transportados en el cuerpo a través del sistema linfático y vascular. Básicamente, existen dos formas de transporte: Los ácidos grasos pueden ser transportados como triacilgliceroles, que es el principal componente de las lipoproteínas circulantes tales como los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad o como ácidos grasos no esterificados que se unen a las proteínas plasmáticas, en particular albúmina plasmática. Los ácidos grasos libres que están completamente no ligados tienen una solubilidad muy baja y sólo se presentan en concentraciones muy bajas.

50 La composición, distribución y concentración de ácidos grasos en la sangre humana puede variar mucho y está compuesta por la suma de las diferentes fracciones de plasma: El éster de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos, así como ácidos grasos ligados a la albúmina. Los ácidos grasos saturados en la sangre humana se componen principalmente de ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0). El principal tipo de ácidos grasos monoinsaturados pertenecen al grupo del ácido oleico (18:1) y el ácido palmitoleico (16:1). Los ácidos grasos omega-3 poli-insaturados incluyen el ácido linolénico (18:3), ácido eicosapentaenoico (20:5), ácido docosapentaenoico (22:5) y ácido docosahexaenoico (22:6). Los ácidos grasos omega-6 poli-insaturados son principalmente ácido linoleico (18:2), ácido eicosadienoico (20:2), ácido dihomogamalinolénico (20:3), ácido araquidónico (20:4), ácido adrénico (22:4) y ácido docosapentaenoico (22:5). La concentración de otros ácidos grasos es normalmente muy baja en la sangre entera, pero

puede variar dependiendo de la genética, la alimentación y el estilo de vida.

Las concentraciones de ácidos grasos en la sangre se incrementan en pacientes obesos y contribuyen a la diabetes tipo 2, la esteatosis hepática y varios trastornos cardiovasculares tales como la aterosclerosis. Se ha dilucidado el papel patogénico de los ácidos grasos en el desarrollo de la aterosclerosis y enfermedades asociadas tales como la disfunción cerebral, del miocardio, renal y eréctil. Si bien no pretende ser exhaustivo, algunos aspectos deben señalarse a continuación. Se encontró que una elevación de los ácidos grasos era responsable del aumento de la formación de radicales de oxígeno reactivo que causa la disfunción endotelial que puede ser atenuada por un antioxidante (Pleiner et al, la disfunción endotelial inducida por FFA se puede corregir con la vitamina C. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87, 2913-7). Este efecto se incrementa con los ácidos grasos trans que se sospecha que pueden tener otros efectos nocivos (López García et al, El consumo de ácidos grasos trans se relaciona con bio-marcadores plasmáticos de inflamación y disfunción endotelial *J Nutr* 2005, 135, 562-566; Mozaffarian et al, Efectos sobre la salud de los ácidos grasos trans: evidencia experimental y observacional. *Eur J Clin Nutr* 2009, 63 Suppl 2, S5-21). Se les acusa de aumentar la presión arterial y se encontró que son un factor patogénico en la hipertensión arterial (Zheng et al, Composición de ácidos grasos plasmáticos e incidencia de 6 años de la hipertensión en adultos de mediana edad: El estudio Riesgo de la aterosclerosis en las comunidades (ARIC) *Am J Epidemiol* 1999, 150, 492-500). Se encontró que los ácidos grasos trans aumentan el riesgo de infarto de miocardio y muerte cardiaca súbita (Ascherio et al, Ingesta de ácidos grasos trans y el riesgo de infarto de miocardio. *Circulación* 1994, 89, 94-101; Baylin et al, High 18:02 los ácidos grasos trans en el tejido adiposo se asocian con un mayor riesgo de infarto agudo de miocardio en adultos de Costa Rica. *J Nutr* 2003, 133, 1186-1191). Junto con una elevación crónica de las concentraciones de ácidos grasos en la sangre, son responsables de la resistencia a la insulina y el desarrollo de la diabetes mellitus (Krachler et al, Perfil de los ácidos grasos de la membrana de los eritrocitos que precede el desarrollo de la diabetes mellitus Tipo 2. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008, 18, 503 -510; Lionetti et al, De la sobrealimentación crónica a la resistencia a la insulina: El papel de la capacidad de almacenamiento de grasa y la inflamación. *Nutr Metab Dis Cardiovasc* 2009, 19, 146-152; Yu et al, Mecanismo por el cual los ácidos grasos inhiben la activación de la insulina de la actividad de la 3-quinasa del fosfatidilinositol asociado a (IRS-1) del sustrato-1 del receptor de insulina. *J Biol. Chem.* 2002, 277, 50.230 a 50.236). En conjunto, se cree ahora que un aumento del volumen de ácidos grasos como resultado de la sobrealimentación crónica es el mecanismo patógeno más importante en el desarrollo de las enfermedades más comunes en los países industrializados (Bays, "La grasa en los enfermos", enfermedad metabólica y aterosclerosis. *Am J Med.* 2009, 122, S26-37). No hay tratamiento médico para la reducción eficaz del sobrepeso (Aronne et al, Cuando falla la prevención: Estrategias para el tratamiento de la obesidad. *Am J Med* 2009, 122, S24-32). Sin embargo, pueden encontrarse personas obesas que tienen éxito en la reducción del peso corporal y, por lo tanto, una reducción significativa de los trastornos inducidos por los ácidos grasos (Lien et al, El proyecto STEDMAN: efectos biofísicos, bioquímicos y metabólicos de una intervención conductual de pérdida de peso durante la pérdida de peso, mantenimiento y recuperación. *Omics* 2009, 13, 21-35; Schenk et al, La sensibilidad mejorada a la insulina después de la pérdida de peso y el ejercicio está mediada por una reducción en la movilización de los ácidos grasos plasmáticos, no la capacidad oxidativa mejorada. *J Physiol* 2009, 587, 4949-4961). Por lo tanto, un dispositivo médico para reducir eficazmente la cantidad total de ácidos grasos y preferentemente aquellos con mayor patogenicidad es deseable. Se encontró que la extracción quirúrgica del tejido adiposo subcutáneo era ineficaz en la reducción de las concentraciones circulantes de ácidos grasos o de su contenido cualitativo. La eliminación de la fracción de lipoproteínas que lleva altas concentraciones de colesterol por adsorción directa desde la sangre puede lograrse por adsorción o filtración de estas partículas. Estos procedimientos para la purificación de la sangre en línea se llaman aféresis LDL. Aunque están diseñados para reducir el colesterol LDL, también adsorben los triglicéridos. Sin embargo, la cantidad de triglicéridos extraída no es suficiente para una reducción eficaz del contenido corporal de ácidos grasos. El contenido de ácido graso de la sangre es bajo en el estado de sujeción en reposo. Sin embargo, se observa un aumento significativo durante la lipólisis (ver más abajo). Debido a la insolubilidad en un medio acuoso, se lleva a cabo el transporte de ácidos grasos no esterificados mediante proteínas y estructuras celulares (Spector et al, Utilización de ácidos grasos libres de cadena larga por las plaquetas humanas. *J Clin Invest* 1970, 49, 1489-1496). La proteína principal de transporte en la sangre es la albúmina. Se ha documentado la presencia de al menos 10 sitios específicos de ligamiento para los ácidos grasos. Sin embargo, la capacidad de ligamiento puede aumentar drásticamente mediante la formación de estructuras micelares con ácidos grasos en una condición de exceso de ácidos grasos u otros lípidos (Schubiger et al, Micelas mixtas: Una nueva solución libre de problemas para el ácido omega-<sup>123</sup>I-heptadecanoico en comparación. *Nuklearmedizin* 1984, 23, 27-28). Con una molaridad de albúmina de aproximadamente 600 μmol/l, existiría una capacidad de ligamiento de al menos 0,006 mol/l para los ácidos grasos, lo que equivale a aproximadamente 0,0035 kg/l (Berk y Stump, Mecanismos de captación celular de ácidos grasos libres de cadena larga. *Mol Cell Biochem* 1999, 192, 17-31). Además, los ácidos grasos son transportados en forma esterificada como mono-, di- o triacil glicerol. La concentración sérica de fijación varía considerablemente. Sin embargo, los valores normales están configurados para estar por debajo de 150 mg/dl (1,7 mmol/l). Después de la ingestión o durante el ejercicio, la concentración puede aumentar varias veces e incluso exceder los 1000 mg/dl (11,3 mmol/l). Sólo existen algunos informes que investigan las diferencias en el contenido de lípidos en varios lugares en la circulación. En estas investigaciones, se encontraron valores significativamente más altos para los ácidos grasos y triglicéridos presentes en el sistema venoso central (vena cava), en comparación con otros sitios de medición (Wiese et al, Composición de lípidos del sistema vascular durante la infancia, la niñez y la juventud, *J. Lipid Res.* 1967, 8, 312-320; Zauner et al, Diferencias pulmonares arteriales-venosas en los lípidos y metabolitos de los lípidos. *Respiración* 1985, 47

214-219). No existen informes acerca de los cambios del contenido de lípidos venosos centrales durante el ejercicio y la lipólisis inducida.

Se encontró ahora que, durante el ejercicio físico, el contenido de lípidos aumenta bruscamente en las venas abdominales centrales mostrando un aumento de la diferencia en el contenido de lípidos entre el sitio la central comparado con un sitio periférico de evaluación según se describe a continuación.

De este modo, la reducción del contenido de ácidos grasos en la sangre utilizando los métodos y los dispositivos y los compuestos solubilizantes que aquí se divulgan es útil para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente asociadas con un nivel elevado de ácidos grasos en la sangre o en el organismo.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con el tratamiento y profilaxis de trastornos inducidos por los ácidos grasos tales como la diabetes tipo 2, esteatosis hepática, trastornos cardiovasculares tales como la hipertensión arterial, infarto de miocardio, derrame cerebral, muerte cardíaca súbita, aterosclerosis, enfermedades asociadas con la aterosclerosis, tales como disfunción cerebral, del miocardio, renal y eréctil, así como con la reducción de peso y la reducción del colesterol y también con la prevención de la resistencia a la insulina y la prevención del desarrollo de la diabetes mellitus mediante el uso de los compuestos de solubilización que aquí se divulgan con el fin de eliminar los ácidos grasos de la sangre .

### Lipólisis

Los ácidos grasos plasmáticos son un sustrato energético importante. La disponibilidad de ácidos grasos se determina principalmente por su movilización desde las provisiones de triacilgliceroles del tejido adiposo por el proceso de lipólisis. En el hombre, la lipólisis del tejido adiposo está regulada por una serie de señales hormonales, paracrinas y/o autocrinas. Las señales hormonales principales pueden estar representadas por las catecolaminas, insulina, hormona del crecimiento, péptidos natriuréticos, tiroxina y algunas adipocitoquinas (Stich y Berlan, Regulación fisiológica de la disponibilidad NEFA: Vía de lipólisis. Proc Nutr Soc 2004, 63, 369-374). Los niveles absolutos y la importancia relativa y la contribución de estas señales varían en diferentes situaciones fisiológicas, con la dieta y el ejercicio físico siendo las principales variables fisiológicas que afectan la señalización hormonal. Una familia de enzimas llamadas lipasas con distintas funciones es responsable de la ruptura de los triglicéridos almacenados dentro de las células de grasa para el almacenamiento de energía. Los carbohidratos y los ácidos grasos son los combustibles energéticos principales para la contracción muscular. Durante el ejercicio, la lipólisis libera  $7,1 \pm 1,2$  micromol x min ( $-1$ ) x kg ( $-1$ ) de peso corporal, lo que daría lugar a una liberación de ácidos grasos de 4200  $\mu$ mol por hora en una persona con un peso de 100 kg que es igual a 0,15 kg ácidos grasos (Coggan et al, Metabolismo de las grasas durante el ejercicio de alta intensidad en hombres entrenados en resistencia y no entrenados. Metabolismo 2000, 49, 122-128). Sin embargo, la estimulación de la lipólisis por intervención farmacológica y/o medidas físicas locales puede aumentar aún más la capacidad lipolítica. La lipólisis se incrementó hasta 3 veces mediante la aplicación sistémica de agonistas de los receptores naturales o drogas (Riis et al, Lipólisis regional elevada en el hipertiroidismo. J Clin Endocrinol Metab 2002, 87, 4747-4753; Barbe et al, Evaluación in situ de la función de los adrenoreceptores beta 1, beta 2 y beta 3 en el control de la lipólisis y el flujo sanguíneo nutritivo en el tejido adiposo subcutáneo humano. Br J Pharmacol 1996, 117, 907-913). Lo agonistas de los receptores adrenérgicos que exhiben estimulación de la lipólisis son: Adrenalina, noradrenalina, isoprenalina, efedrina, isoproteriol, salbutamol, teofilina, fenoterol, orciprenalina, entre otros. Los efectos lipolíticos también se han descrito a partir de alteraciones físicas del tejido adiposo. Los investigadores encontraron que el ultrasonido tenía un efecto de licuación sobre el tejido adiposo dando lugar a una reducción del contenido de tejido graso cuando se realiza durante la inanición (Faga et al, Lipólisis asistida por ultrasonido del epiplón en cerdos enanos. Aesthetic Plast Surg 2002, 26, 193-196; Miwa et al, Efecto de la aplicación de ultrasonido en la movilización de las grasas. Fisiopatología, 2002, 9, 13).

Si bien para todas las medidas antes mencionadas, se ha documentado el incremento de la lipólisis, el efecto mensurable sobre las concentraciones de ácidos grasos no esterificados fue reducido. En una investigación piloto, se encontró que, después de la estimulación de la lipólisis, el contenido de ácidos grasos aumentó enormemente cuando se midió mediante el método de la invención para la solubilización de los ácidos grasos. Además, se encontró que el contenido de ácidos grasos fue mucho mayor en el sistema venoso abdominal que en la circulación periférica. Este hallazgo es sorprendente, ya que no se ha observado en estudios con animales al medir simultáneamente varios sitios de extracciones de sangre.

Por lo tanto, la estimulación de la lipólisis al efectuar la purificación de la sangre de los ácidos grasos por el procedimiento de la invención y utilizando una vena abdominal central como sitio de acceso es una realización preferida de la invención.

La fracción de extracción podría incrementarse si el contenido de ácidos grasos esterificados y no esterificados transportados en la sangre pudiera elevarse mientras se realiza el procedimiento. Sorprendentemente, esta tarea podría ser resuelta mediante el aumento de la lipólisis a través del método de la invención.

### Comportamiento de los ácidos grasos en medio acuoso en cuanto a la solvatación y la adhesión

La solubilidad de los ácidos carboxílicos en agua es mínima cuando la longitud de la cadena de carbono

excede los 4 átomos de carbono y en ausencia de grupos hidroxilo (-OH), grupos carboxilo (-COOH) u otros grupos hidrófilos polares o cargados y/o por introducción de sustituyentes de alquilo u otros grupos lipófilos.

La solubilidad puede ser aumentada con detergentes que penetran en las micelas de los ácidos grasos reduciendo así su estabilidad y su tamaño, y aumentando el número de moléculas de los ácidos grasos libres en el medio acuoso.

5 Tanto los ácidos grasos libres como las micelas tienden a ligarse a estructuras lipotrópicas. Entre ellos están el carbono, los metales, las cerámicas y los polímeros sintéticos y naturales. Además, las estructuras orgánicas llevan regiones lipófilas, algunos de las cuales están designados para ligarse específicamente a los ácidos grasos, que forman proteínas de transporte de lípidos o membrana. Los sitios de ligamiento estéricos están en su mayoría recubiertos por aminoácidos hidrófobos. En la sangre, los lípidos están electrostáticamente ligados a las proteínas de transporte especializadas. Los ácidos grasos se transportan principalmente por la albúmina. El ligamiento de los ácidos grasos en la molécula de albúmina se basa también en fuerzas electrostáticas que se localizan en las bolsas hidrofóbicas. La energía de ligamiento de estas bolsas varía, no obstante, el  $pK_a$  para todas ellas es sustancialmente mayor que la CMC de los ácidos grasos. Por lo tanto, los ácidos grasos permanecen en el medio circundante, incluso después de la eliminación completa de los ácidos grasos libres. Se encontró que la extracción de los ácidos grasos de la albúmina era casi completa cuando se utilizaban solventes orgánicos para su liberación debido a la mejor disolución en los solventes orgánicos. Sin embargo, los solventes alteran la estructura de la proteína, lo que los hace inadecuados para su posterior procesamiento o utilización en un organismo vivo. Para utilizar la albúmina para fines médicos o de otro tipo, es necesario reducir el contenido de ácidos grasos sin alterar la estructura y la funcionalidad de la albúmina. Esta tarea se puede resolver mediante partículas de carbono activadas que poseen una mayor afinidad de ligamiento a los ácidos grasos que la albúmina. Sin embargo, este proceso requiere etapas adicionales para la purificación de la albúmina. Por lo tanto, hasta ahora no existe un procedimiento que permita la liberación rápida y la solubilización del contenido total de ácidos grasos de una molécula de albúmina en un medio acuoso que no altere la ultraestructura y la función de las moléculas de albúmina.

Los ácidos carboxílicos también son transportados dentro de las vesículas de los fosfolípidos. Las interacciones electrostáticas entre las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos carboxílicos y las de los fosfolípidos evitan que los ácidos carboxílicos se difundan a un medio acuoso circundante. Mutatis mutandis, esto se aplica también a otras soluciones orgánicas, biomásas o aguas de desechos orgánicos. En soluciones orgánicas destinadas al refinamiento adicional, la purificación o el uso en donde es deseable no utilizar un solvente orgánico, es deseable un procedimiento alternativo biocompatible. Hasta ahora, dicho procedimiento no existe.

Sorprendentemente, este objetivo puede alcanzarse con el uso de al menos un compuesto de solubilización, según aquí se divulga, que comprende al menos un amidino y/o al menos una fracción de guanidino y especialmente compuestos de solubilización de la fórmula general (I), (II) y (III) y más especialmente arginina y derivados de la misma.

Los ácidos carboxílicos que deberán eliminarse están contenidos normalmente en un medio acuoso o una solución acuosa como la sangre o el plasma sanguíneo o en una emulsión acuosa como la leche o en un medio orgánico como el combustible, gas, biodiesel, gasolina, bencina y similares o en aceites tales como los aceites vegetales, por ejemplo, el aceite de linaza, aceite de nuez, aceite de linaza, aceite de onagra, aceite de girasol, aceite de semilla de girasol, aceite de soja, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de oliva virgen, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de cacahuete, semilla de algodón, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de uva, aceite de avellana, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sésamo, así como también aceites animales tales como el aceite de pescado o contenidos en grasas tales como la mantequilla o la margarina.

En caso que el ácido carboxílico esté contenido en agua, un medio acuoso, una emulsión acuosa o una suspensión acuosa, el compuesto solubilizante, al menos uno, se puede añadir directamente al medio acuoso, emulsión o suspensión o el compuesto solubilizante, al menos uno, puede ser disuelto en agua y esta solución acuosa añadirse al medio acuoso, emulsión o suspensión que contiene los ácidos carboxílicos. Después de esta adición, se observa la formación de una nano-emulsión y/o micro-emulsión.

En caso que los ácidos carboxílicos estén contenidos en un medio orgánico o un medio orgánico lipófilo, el compuesto solubilizante se disuelve en agua y la solución del compuesto solubilizante en agua se añade al medio orgánico. Se obtiene una mezcla de dos fases y los ácidos carboxílicos se transfieren a la fase acuosa. Se supone que se forma un complejo o conjunto de un ácido carboxílico de una molécula con el compuesto solubilizante de una molécula o un dímero o trímero del mismo que hace que el ácido carboxílico sea soluble en agua. Por lo tanto, se prefiere mover o agitar la mezcla de dos fases de la capa orgánica y acuosa con el fin de obtener una mezcla intensiva de las dos capas. Los ácidos carboxílicos contenidos en la fase acuosa puede eliminarse mediante la separación de fases. Si se desea, el método de extracción se puede repetir.

En caso que los ácidos carboxílicos estén contenidos en un aceite o grasa, el compuesto solubilizante se disuelve en agua y la solución del compuesto solubilizante en agua se añade al aceite o grasa. Si se desea, un solvente orgánico puede ser añadido al aceite o grasa con el fin de reducir la viscosidad del aceite o grasa para hacer que el aceite o grasa sean más fáciles de agitar. La mezcla del aceite o de la grasa y la solución acuosa del compuesto de solubilización se agitan. El ácido carboxílico se transfiere a la fase acuosa y la fase acuosa se puede eliminar mediante decantación o separación por fases. El proceso de extracción puede repetirse varias veces si se desea.

Se divulga una micro-emulsión acuosa y/o una nano-emulsión acuosa que contienen al menos un compuesto de solubilización y al menos un ácido carboxílico en forma micro-emulsionada o nano-emulsionada.

Si el compuesto solubilizante se usa en más de 1,2 a 2,8, preferentemente de 1,5 a 2,5 y más preferentemente en más de 1,7 a 2,3 equivalentes moleculares, es posible eliminar más de 90% de los ácidos carboxílicos en una sola etapa de extracción. Si la etapa de extracción se repite dos veces, puede eliminarse hasta el 99% de los ácidos carboxílicos.

5 Los ácidos carboxílicos que se pueden eliminar son especialmente los ácidos carboxílicos con más de 5 átomos de carbono, más preferentemente con más de 7 átomos de carbono y se prefiere especialmente con más de 9 átomos de carbono. De preferencia, los ácidos carboxílicos son los ácidos grasos que aquí se divulgan; al mismo tiempo pueden eliminarse también otros compuestos lipófilos que contienen un grupo carboxilo o un grupo de ácido carboxílico, como fármacos o toxinas, mediante este método. Un ácido carboxílico que se deslinda explícitamente de la presente  
10 invención es el naproxeno. Además, no es el propósito de la presente invención proporcionar métodos y compuestos o dispositivos para la solubilización de productos farmacéuticos con el fin de preparar formulaciones galénicas. Especialmente preferida es la extracción y solubilización de ácido nafténico del aceite, bencina, gasolina y combustible. Además, los ácidos carboxílicos preferidos son aquellos ácidos carboxílicos que contienen enlaces dobles y/o triples, como los ácidos grasos insaturados y poli-insaturados. Aún más preferidos son los ácidos carboxílicos fisiológicos y especialmente aquellos ácidos carboxílicos fisiológicos que se producen en los seres humanos. Para fines industriales, los ácidos grasos insaturados se eliminan y solubilizan preferentemente desde el material fuente, como aceites y grasas, mientras que para fines médicos, los ácidos grasos saturados se eliminan preferentemente de la sangre del paciente. Además, estos ácidos carboxílicos se prefieren porque se producen en el aceite y las grasas del origen antes mencionado, especialmente de animales como los peces, el grano, las aceitunas, el maíz, los cultivos, el arroz, la soja y similares. En caso que los ácidos carboxílicos que deberán eliminarse del medio orgánico, como grasas, ceras, aceite, combustible, bencina y similares, estén contenidos en forma esterificada (es decir, estén ligados en ésteres), puede llevarse a cabo una etapa de saponificación antes de realizar la eliminación y solubilización de la invención. Tal saponificación se lleva a cabo preferentemente en una mezcla de solvente de agua y al menos un segundo solvente miscible con agua. Otros ácidos carboxílicos preferidos son los ácidos carboxílicos perfluorados como el ácido perfluoropropiónico, ácido perfluorooctanoico (PFOA), ácido perfluorodecanoico, ácido perfluorododecanoico, ácido perfluorohexadecanoico, así como también otros ácidos carboxílicos perfluorados y el ácido profirínico.  
20 La presente invención se refiere también a la solubilización, respectivamente la eliminación de ácidos carboxílicos aromáticos que pertenecen a los grupos objetivo mencionados anteriormente, como el ácido benzoico, ácido 4-aminobenzoico, ácido antranílico, ácido bencílico, ácido cinámico, ácido salicílico, ácido fenilacético, ácido 4-metoxifenilacético, ácido gálico, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido abiético, ácido bicinconfínico, ácido quínico, ácido corísmico, ácido clavulánico, ácido fusárico, ácido fusídico, ácido úrico, ácido hipúrico, ácido iboténico, ácido indol-3-acético, ácido mandélico, ácido estífnico, ácido úsnico, ácido abscísico, ácido trópico, ácido benzoquinonetetracarboxílico, ácido boswélico, ácido cafeico, ácido carmínico, ácido quenodesoxicólico, ácido cumárico, ácido cromoglícico, cinarina, ácido meclofenámico, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido domoico, ácido pipemídico, ácido ferúlico, ácido 5-hidroxiferúlico, ácido isoftálico, ácido mefenámico, ácido *meta*-cloroperoxibenzoico, ácido peroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido nalidíxico, ácido sinápico, ácido sucronónico.  
25 Especialmente preferida es la eliminación y solubilización de los ácidos carboxílicos de la sangre que conducen a diversas enfermedades causadas y/o asociados con un nivel mayor y/o poco saludable de tales ácidos carboxílicos y en especial ácidos grasos.  
30 Los ácidos carboxílicos son preferentemente lipófilos y de preferencia tienen un coeficiente de partición entre n-octanol y agua (también conocido como log  $K_{OW}$  u octanol-agua-coeficiente de partición) de  $>2,0$ , preferentemente de  $>3,0$  y más preferentemente de  $>4,0$ . (Por ejemplo: el log  $K_{OW}$  del ácido acético es  $-0,17$ , del ácido butírico es  $0,79$ , del ácido octanoico es  $3,05$  y del ácido decanoico es  $4,09$ ).  
35 También se prefiere si los ácidos carboxílicos que deberá eliminar tienen un valor  $pK_s >4,85$ , preferentemente  $>4,87$ . (Por ejemplo: el ácido acético tiene un  $pK_s$  de  $4,76$ , el ácido butírico de  $4,82$ , el ácido pentanoico de  $4,84$  y el ácido octanoico de  $4,89$ ).

40 De este modo, la presente invención proporciona un método para separar los ácidos carboxílicos que no son solubles en absoluto o no son solubles en agua y pueden solubilizarse en agua por medio de los compuestos solubilizantes que aquí se divulgan, preferentemente en forma de nano- o micro-emulsiones. Una vez transferidos a la fase acuosa, los ácidos grasos pueden eliminarse mediante diversas técnicas aquí divulgadas.  
45 Por lo tanto, se usa un compuesto solubilizante para solubilizar ácidos carboxílicos en un medio acuoso u orgánico, en donde dicho compuesto solubilizante contiene al menos un grupo amidino y/o al menos un grupo guanidino y en donde el compuesto tiene un coeficiente de partición entre n-octanol y agua de  $K_{OW} <6,30$ .

50 El término "ácidos carboxílicos solubilizantes en un medio acuoso u orgánico" debe entenderse de la siguiente manera: los ácidos carboxílicos que deberán solubilizarse están contenidos en un medio orgánico, como aceites o combustible, o en un medio acuoso, como la sangre o la leche y se solubilizan mediante el uso de un compuesto de solubilización en la fase acuosa.

60 Además, se usa un compuesto solubilizante para solubilizar ácidos carboxílicos lipófilos en un medio acuoso, en donde dicho compuesto solubilizante contiene al menos un grupo amidino y/o al menos un grupo guanidino y en donde el compuesto tiene un coeficiente de partición entre n-octanol y agua de  $K_{OW} <6,30$ . En los casos en que los ácidos carboxílicos están contenidos en la fase acuosa, por ejemplo la sangre, sólo cantidades muy pequeñas de ácidos carboxílicos libres están presentes en la sangre, ya que estos ácidos carboxílicos y en especial los ácidos grasos son  
65

muy poco solubles en agua. La mayoría de los ácidos carboxílicos que deben eliminarse de la sangre están ligados a otros compuestos como la albúmina y ya no son ácidos carboxílicos libres. Sin embargo, existe un equilibrio entre la cantidad muy pequeña de ácidos carboxílicos libres en la sangre y los ácidos carboxílicos de otro modo ligados o depositados que ya no se consideran libres. Si ahora, por medio del método de la invención, los ácidos carboxílicos libres son complejados mediante el compuesto de solubilización, estos ácidos carboxílicos libres se eliminan del equilibrio y los ácidos carboxílicos ligados a la albúmina se liberan a la sangre, los que pueden volverse a eliminar por el método de la invención de modo que finalmente casi todos los ácidos carboxílicos contenidos en la sangre en forma libre o ligada puede ser eliminados. En especial, la diálisis es adecuada para este proceso continuo de eliminación de los ácidos carboxílicos y en especial ácidos grasos de la sangre.

Los compuestos solubilizantes que aquí se describen comprenden al menos un grupo amidino o al menos un grupo guanidino o al menos un grupo amidino y al menos un grupo guanidino. Si el grupo amidino no es sustituido, puede representarse mediante la siguiente fórmula  $H_2N-C(NH)-$ . Pero también es posible que los tres átomos de hidrógeno están se reemplacen con los sustituyentes R, R' y R" como se representa mediante la siguiente fórmula general  $(R)(R')N-C(NR'')$ . Se prefiere si dos de los tres átomos de hidrógeno se reemplazan con un sustituyente como se representa mediante la siguiente fórmula:  $(R')NH-C(NR'')$  o  $(R)(R')N-C(NH)-$ . De este modo, se prefieren los grupos amidino con al menos un hidrógeno. Si el grupo guanidino no es sustituido, puede representarse mediante la siguiente fórmula  $H_2N-C(NH)-NH-$ . Pero también es posible que los cuatro átomos de hidrógeno se reemplacen con los sustituyentes R, R', R" y R'" como se representa mediante la siguiente fórmula  $(R)(R')N-C(NR'')-N(R''')$ . Se prefiere si tres de los cuatro átomos de hidrógeno se reemplazan con un sustituyente como se representa mediante la siguiente fórmula:  $(R')NH-C(NR'')-N(R''')$  o  $(R)(R')N-C(NH)-N(R''')$  o  $(R)(R')N-C(NR'')-NH-$ . De este modo, los grupos guanidino con al menos un hidrógeno y, preferentemente, con dos hidrógenos son los preferidos.

El compuesto solubilizante comprende o contiene al menos un grupo amidino y/o al menos un grupo guanidino, mientras que se prefieren los grupos guanidino. Además, el compuesto solubilizante comprende o contiene, preferentemente, no más de 15 átomos de carbono, más preferentemente no más de 14, más preferentemente no más de 13, más preferentemente no más de 12, más preferentemente no más de 11, más preferentemente no más de 10, más preferentemente no más de 9 y más preferentemente no más de 8 átomos de carbono y más preferentemente el compuesto de solubilización es un derivado de la arginina. En el caso de los compuestos solubilizantes poliméricos u oligoméricos, se prefiere que estén presentes por fracción de amidino o por fracción de guanidino no más de 10 átomos de carbono y más preferentemente no más de 8 átomos de carbono.

Además, el compuesto de solubilización es hidrófilo y puede contener preferentemente uno o más de los siguientes sustituyentes:

$-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-PO_3H_2$ ,  $-PO_3H^-$ ,  $-PO_3^{2-}$ ,  $-OPO_3H_2$ ,  $-OPO_3H^-$ ,  $-OPO_3^{2-}$ ,  $-COOH$ ,  
 $-COO^-$ ,  $-CO-NH_2$ ,  $-NH_3^+$ ,  $-NH-CO-NH_2$ ,  $-N(CH_3)_3^+$ ,  $-N(C_2H_5)_3^+$ ,  $-N(C_3H_7)_3^+$ ,  
 $-NH(CH_3)_2^+$ ,  $-NH(C_2H_5)_2^+$ ,  $-NH(C_3H_7)_2^+$ ,  $-NHCH_3$ ,  $-NHC_2H_5$ ,  $-NHCH_2CH_3$ ,  $-NH_2CH_3^+$ ,  
 $-NH_2C_2H_5^+$ ,  $-NH_2C_3H_7^+$ ,  $-SO_3H$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-SO_2NH_2$ ,  $-CO-COOH$ ,  $-O-CO-NH_2$ ,  
 $-C(NH)-NH_2$ ,  $-NH-C(NH)-NH_2$ ,  $-NH-CS-NH_2$ ,  $-NH-COOH$ .

También se prefieren los compuestos solubilizantes que son derivados de la arginina o que son dipéptidos o tripéptidos o polipéptidos que contienen la arginina del aminoácido o un derivado de la arginina.

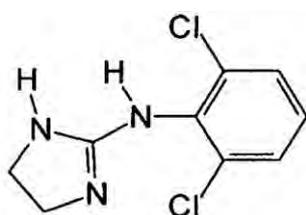
También es posible que el grupo amidino o el grupo guanidino sea parte de un sistema de anillos heterocíclicos como en el imidazol, histidina, clotianidina o ácido 4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ilamino)-butírico.

Los compuestos solubilizantes son hidrófilos y tienen un coeficiente de partición entre n-octanol y agua (también conocido como  $K_{OW}$  u octanol-agua-coeficiente de partición) de  $K_{OW} < 6,30$  ( $\log K_{OW} < 0,80$ ), preferentemente  $K_{OW} < 1,80$  ( $\log K_{OW} < 0,26$ ), más preferentemente  $K_{OW} < 0,63$  ( $\log K_{OW} < -0,20$ ) y más preferentemente  $K_{OW} < 0,40$  ( $\log K_{OW} < -0,40$ ).

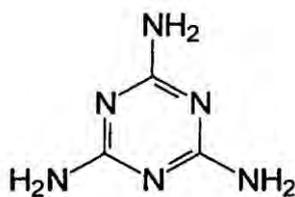
Los compuestos de solubilización preferidos son:

Ácido L-2-amino-3-guanidinopropiónico, L-arginina, L-NIL, H-homoarg-OH, histidina, N $\omega$ -nitro-L-arginina, N- $\omega$ -hidroxi-L-norarginina, D-arginina metil éster, nomega-monometil-L-arginina, NG,NG-dimetilarginina, D-(+)-octopina, ácido argininosuccínico, L-canavanina base libre, creatina, ácido guanidinoacético, ácido 3-guanidinopropiónico, ácido 4-guanidinobutírico, ácido 4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ilamino)-butírico, ácido (S)-(-)-2-guanidinoglutárico, ácido 6-guanidinohexanoico, guanidino, sulfaguanidina, agmatinsulfato, ácido 4-guanidinobenzoico, 1,3-di-o-tolil-guanidina, clotianidina, L-ornitina, N-guanilurea, cimetidina, 1-(o-tolil)biguanida, clorhexidina, 1,1-dimetilbiguanida, proguanil, polihexanida, poli-L-arginina (de 70,000 a 150,000 MW), diminazeno, melanina, 4-(4,6-diamino-2,2-dimetil-2H-[1,3,5]triazina-1-il, imidazol, metilimidazol, Tyr-Arg (quiortorfina), Arg-Gln, Gly-Arg, Arg-Phe, Arg-Glu, Lys-Arg acetato, His-Arg, Arg-Gly-Asp (RGD), Arg-Phe-Ala, Thr-Lys-Pro-Arg (tuftsina), Gly-Gly-Tyr-Arg, Gly-His, argatroban, L-NMMA (L-NG-monometil-arginina), L-NAME (L-nitro-arginina-metil éster), L-hidroxi-arginina-citrato, dimetilarginina (ADMA), D-homoarginina, norarginina, L-canavanina (2-amino-4-(guanidinooxi)-butírico), 4-guanidino-fenilalanina, 3-guanidino-fenilalanina, ácido O- $\alpha$ -hipuril-L-arginínico, H-Arg-AMC (L-arginina-7-amido-4-metilcumarina), L-TAME (p-tosil-L-arginina-metil éster),

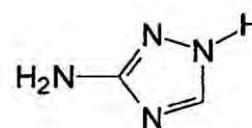
difenilacetilo-D-Arg-4-hidroxi-bencilamida, agmatina (argamina; 1-amino-4-guanidinobutansulfato), L-arginina-etil éster, L-arginina-metil éster, guanidina, guanidinacetato, guanidincarbonato, guanidinnitrato, guanidintiocianato, guanilurea, guanilurea fosfato, guanilurea dinitramida, 2-guanidinoacetaldehid-dietilacetato, diciandiamida, 2-guanidinobencimidazol, S-((2-guanidino-4-tiazolil)metil)-isotio urea, guanidinobutilaldehido, ácido 4-guanidinobenzoico, leonurina (4-guanidino-n-butilsiringato), ambazon ([4-(2-(diaminometilideno)-hidrazinil)fenil]iminotio urea), amilorida (3,5-diamino-N-carbamimidol-6-clorpirazin-2-carbamida), aminoguanidina, amitrol (3-amino-1,2,4-triazol), nitroguanidina, argininosuccinato, barettin ((2S,5Z)-ciclo-[(6-bromo-8-entriptófano)-arginina]), lisina, la clorhexidina (1,1'-hexametilenbis[5-(4-clorofenil)-biguanida]), cimetidina (2-ciano-1-metil-3-[2-(5-metilimidazol-4-ilmetilsulfanil)-etil]-guanidina, clonidina (2-[(2,6-diclorofenil)imino]imidazolidina), clotianidina ((E)-1-(2-clor-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidina), 2,4-diaminopiridina, N,N'-di-otolilguanidina, guanetidina, creatina, creatinina, quiotorfina (L-tirosil-L-arginina), lugdunam, ácido (N-(4-cianofenil)-N-(2,3-metilendioxi-bencilo) guanidinacético, metformina (1,1-dimetilbiguanida), octopina (N<sup>β</sup>-(1-carboxietil)arginina), polihexanida (polihexametilenbiguanida (PHMB)), proguanil (1-(4-clorofenil)-5-isopropilbiguanida), sulfaguanidina (4-amino-N-(diaminometil)encensulfonamida), tetrazeno (4-amidino-1-(nitrosaminoamidino)-1-tetrazena), L-arginina-4-metoxi-β-naftilamida, L-arginina-β-naftilamida, L-arginina-hidroxamato, L-arginina-p-nitroanilida, N-α-benzoil-DL-arginina, Nω-nitro-L-arginina, robenidina, (1,3-bis[(4-clorobencilideno)amino]-guanidina, 1-(2,2-dietoxietil)guanidina, 1-(p-tolil)-guanidina nitrato.



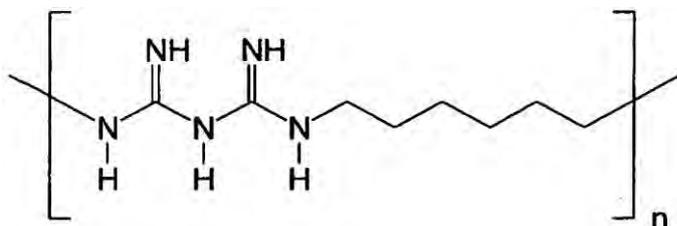
clonidina



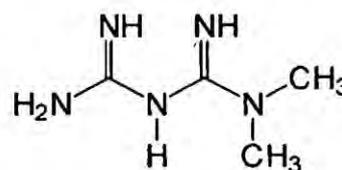
melamina



amitrol



polihexadina



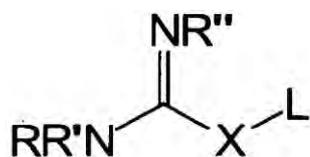
1,1-dimetilbiguanida

La invención puede utilizarse eficazmente en un amplio rango de proporciones de concentración del compuesto solubilizante y los ácidos grasos que se van a solubilizar. A menudo, el contenido de ácido graso de una solución no se conoce en forma exacta. Por lo tanto, debe estimarse la proporción del compuesto solubilizante que se va a añadir. La solubilización de ácidos carboxílicos y en especial ácidos grasos puede alcanzarse cuando la proporción molar de compuesto de solubilización a ácidos grasos (libre y ligada) está en el rango de 1:1000 a 1000:1. Se prefiere un rango de 1:100 a 100:1. Se prefiere más un rango de 1:10 a 10:1. Se prefiere además un intervalo de 1:2 a 2:1. La que más se prefiere es una proporción de 1:1 a 2:1. Se prefiere que el compuesto solubilizante se use en un exceso molar de 3% o 5% o 7% o 8% o 10% o 12% o 15% o 20% o 25% o 30% o 35% o 40% o 45% o 50% o 55% o 60% o 70% o 80% o 90% o 100% o 120% o 140% o 160% o 180% o 200%. Además, se prefiere una proporción molar de ácido graso a compuesto de solubilización de 1:1 a 1:200. Se prefiere más una proporción molar de ácido graso a compuesto de solubilización en el rango de 1:1 a 1:100, más preferentemente de 1:1 a 1:50, aún más preferentemente de 1:1 a 1:30, aún más preferentemente de 1:1 a 1:25, aún más preferentemente de 1:1 a 1:20, aún más preferentemente de 1:1 a 1:15, aún más preferentemente de 1:1 a 1:10, aún más preferentemente de 1:1 a 1:9, aún más preferentemente de 1:1 a 1:8, aún más preferentemente de 1:1 a 1:7, aún más preferentemente de 1:1 a 1:6, aún más preferentemente de 1:1 a 1:5, aún más preferentemente de 1:1 a 1:4, aún más preferentemente de 1:1 a 1:3, aún más preferentemente de 1:1 a 1:2, aún más preferentemente de 1:1 a 1:1,8, aún más preferentemente de 1:1 a 1:1,6, aún más preferentemente de 1:1 a 1:1,5, aún más preferentemente de 1:1 a 1:1,4, también preferentemente de 1:1 a 1:1,3, también preferentemente de 1:1 a 1:1,2, también preferentemente de 1:1 a 1:1,1, también preferentemente de 1:1 a 1:1,05, también preferentemente de 1:1,2 a 1:2,8, también preferentemente de 1:1,4 a 1:2,6, también preferentemente de 1:1,6 a 1:2,4, también preferentemente de 1:1,8 a 1:2,2, más preferentemente de 1:1,9 a 1:2,1 y la más preferida es una proporción molar de ácido graso a compuesto de solubilización en el rango de 1,0:2,0. Estas relaciones molares son preferentemente para compuestos solubilizantes con un grupo amidino o un grupo guanidino. Si el compuesto solubilizante contiene dos grupos amidino o dos grupos guanidino o un grupo amidino y un grupo guanidino, sólo la mitad de la cantidad del compuesto solubilizante se usa

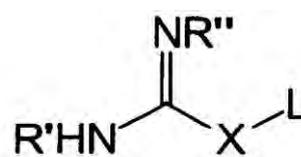
preferentemente. Por lo tanto, en tal caso, una proporción molar de ácido graso a compuesto de solubilización de 1 : 0,5 a 1 : 25, preferentemente de 1 : 0,6 a 1 : 1,4, también preferentemente de 1 : 0,7 a 1 : 1,3, también preferentemente de 1 : 0,8 a 1 : 1,2, también preferentemente de 1 : 0,9 a 1 : 1,1, más preferentemente de 1 : 0,95 a 1 : 1,05 y la más preferida es una proporción molar de ácido graso a compuesto de solubilización en el rango de 1,0 : 1,0.

La solubilización se lleva a cabo preferentemente a un valor de pH > 7,0 y más preferentemente dentro de un rango de pH de 7,0 a 9,0. Sin embargo, dependiendo del medio del cual deben separarse los ácidos carboxílicos, pueden usarse valores de pH de hasta 14, mientras que un rango de pH entre 7,0 y 8,0 se usa preferentemente si los ácidos carboxílicos deben eliminarse de la sangre. Sin embargo, si no se obtiene una solubilización completa, podría añadirse más compuesto solubilizante o el valor pH podría aumentarse o la capa acuosa podría separarse y el proceso de extracción se repite o se utiliza una combinación de estas tres posibilidades.

Algunos de los compuestos de solubilización de la presente invención puede ser representado por la siguiente fórmula general (I) y (II):



formula (I)



formula (II)

donde

R', R'', R''' y R'''' representan independientemente uno de otro -H, -OH, -CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -CH=CH-CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>, -C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, ciclo-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>, ciclo-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>, ciclo-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>, ciclo-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -NO<sub>2</sub>, -C≡CH, -C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-C≡CH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, o R' y R'' forman juntos el residuo -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CO-, -CH=CH-, -CO-CH=CH-, -CH=CH-CO-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-, -CH<sub>2</sub>-CO-CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-

X representa -NH-, -NR''''-, -O-, -S- o -CH<sub>2</sub>- un átomo de carbono sustituido; y

L representa un sustituyente hidrófilo seleccionado del grupo que comprende o que consiste en -NH<sub>2</sub>, -OH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -OPO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CO-NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH-CO-NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NHCH<sub>3</sub>, -NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -NHC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CO-COOH, -O-CO-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-CS-NH<sub>2</sub>, -NH-COOH, o



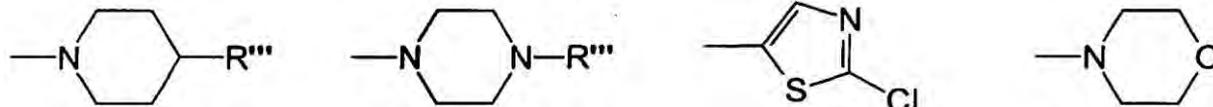
L representa una cadena carbonada lineal o ramificada y saturada e insaturada de C<sub>1</sub> a C<sub>8</sub> con al menos un sustituyente seleccionado del grupo que comprende o que consiste en

-NH<sub>2</sub>, -OH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -OPO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CO-NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH-CO-NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NHCH<sub>3</sub>, -NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -NHC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CO-COOH, -O-CO-NH<sub>2</sub>, -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-CS-NH<sub>2</sub>, -NH-COOH, o

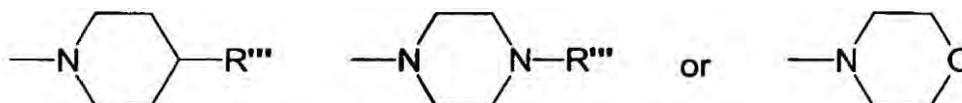


L representa un anillo de benceno y, preferentemente, un anillo de benceno para-sustituido con al menos un

sustituyente seleccionado del grupo que comprende o que consiste en  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}^-$ ,  $-\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ,  $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ ,  $-\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_3^+$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$ ,  $-\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^+$ ,  $-\text{NH}(\text{C}_3\text{H}_7)_2^+$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{NHC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{NHC}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{NH}_2\text{CH}_3^+$ ,  $-\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_5^+$ ,  $-\text{NH}_2\text{C}_3\text{H}_7^+$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CO}-\text{COOH}$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{COOH}$ , o



Sin embargo, dichos compuestos no son preferidos y pueden ser excluidos de la presente solicitud en donde X representa  $-\text{O}-$  o  $-\text{S}-$  y L representa  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}^-$ ,  $-\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ,  $-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+$ ,  $-\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_3^+$ ,  $-\text{NH}(\text{CH}_3)_2^+$ ,  $-\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^+$ ,  $-\text{NH}(\text{C}_3\text{H}_7)_2^+$ ,  $-\text{NHCH}_3$ ,  $-\text{NHC}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{NHC}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{NH}_2\text{CH}_3^+$ ,  $-\text{NH}_2\text{C}_2\text{H}_5^+$ ,  $-\text{NH}_2\text{C}_3\text{H}_7^+$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CO}-\text{COOH}$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{COOH}$ ,

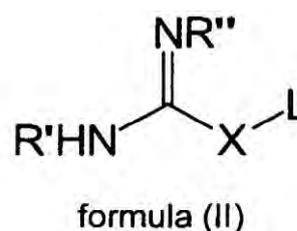
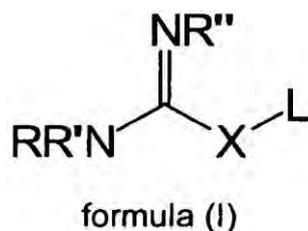


También se excluyen los compuestos en donde X representa  $-\text{NH}-$  o  $-\text{NR}''''-$  y L representa  $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{OPO}_3\text{H}^-$ ,  $-\text{OPO}_3^{2-}$ ,  $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CO}-\text{COOH}$ ,  $-\text{O}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}-\text{CS}-\text{NH}_2$  o  $-\text{NH}-\text{COOH}$ .

El residuo L puede sustituirse adicionalmente por sustituyentes según se definen como  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^{13}$ . El residuo L consiste preferentemente en 1 a 10 átomos de carbono, más preferentemente en 1 a 6 átomos de carbono y más preferentemente en 2 a 4 átomos de carbono. Los átomos de carbono de cualquiera de los sustituyentes tales como  $-\text{COOH}$  presentes en el residuo L se incluyen en el número de átomos de carbono mencionado anteriormente. Por lo tanto, el residuo L contiene una cadena de átomos de carbono lineal o ramificada o un anillo fenilo que podría sustituirse con uno o más sustituyentes alquilo saturados o insaturados y lineales o ramificados y/o sustituyentes definidos como  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^{13}$ .

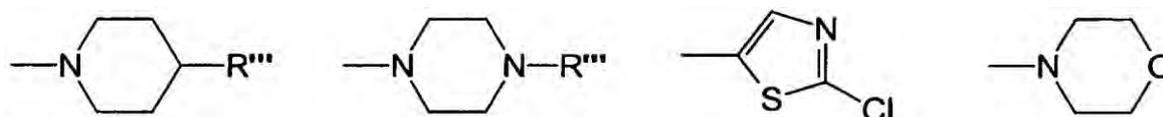
Se prefiere que la cadena carbonada de L esté en el rango de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_7$ , más preferentemente en el rango de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_6$  y con mayor preferencia en el rango de  $\text{C}_1$  a  $\text{C}_5$ .

Los compuestos de fórmula general (I) o (II) que se pueden utilizar para solubilizar los ácidos grasos en un medio acuoso o en el agua se representan mediante la siguiente fórmula (I) o (II):



donde

$\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  y  $\text{R}''''$  representan independientemente uno de otro  $-\text{H}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}_4\text{H}_9$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{C}_5\text{H}_{11}$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_3\text{H}_7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_2\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ ,  $-\text{C}_7\text{H}_{15}$ , ciclo- $\text{C}_3\text{H}_5$ , ciclo- $\text{C}_4\text{H}_7$ , ciclo- $\text{C}_5\text{H}_9$ , ciclo- $\text{C}_6\text{H}_{11}$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{C}_2\text{H}_4-\text{C}\equiv\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_3$ , o  $\text{R}'$  y  $\text{R}''$  formar juntos el residuo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$   
X representa  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{NR}''''-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$  o  $-\text{CH}_2-$  o un átomo de carbono sustituido; y  
L representa  $-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{CR}^4\text{R}^5-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{CR}^6\text{R}^7-\text{CR}^4\text{R}^5-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{CR}^8\text{R}^9-\text{CR}^6\text{R}^7-\text{CR}^4\text{R}^5-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{CR}^{10}\text{R}^{11}-\text{CR}^8\text{R}^9-\text{CR}^6\text{R}^7-\text{CR}^4\text{R}^5-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ,  $-\text{CR}^{12}\text{R}^{13}-\text{CR}^{10}\text{R}^{11}-\text{CR}^8\text{R}^9-\text{CR}^6\text{R}^7-\text{CR}^4\text{R}^5-\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^3$ ;



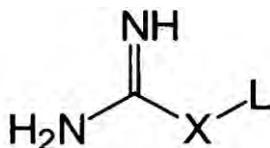


CH=CH-CH=CH-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-CH=CH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH=CH<sub>2</sub>, -  
 CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH=CH<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH=CH-CH=CH<sub>2</sub>, -CH=CH-CH<sub>2</sub>-  
 C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-CH(CH<sub>3</sub>)-CH=CH<sub>2</sub>, -CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-  
 CH(CH<sub>3</sub>)-C≡CH, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, -CH=CH-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -  
 CH=CH-C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH<sub>3</sub>, -CH=C(CH<sub>3</sub>)-CH=CH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-C≡CH, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-CH=CH-CH<sub>3</sub>,  
 -CH=C(CH<sub>3</sub>)-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=CH-C(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)=C(CH<sub>3</sub>)-CH=CH<sub>2</sub>, -CH=CH-CH=CH-  
 CH=CH<sub>2</sub>, -C≡CH, -C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-C≡CH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, -C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-C≡CH,  
 -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C≡C-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C≡CH, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-C≡CH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-  
 C≡C-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -C≡C-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -C≡C-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-  
 CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)-C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-C≡C-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C≡C-CH(CH<sub>3</sub>)-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C≡C-CH<sub>2</sub>-  
 CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-C≡C-CH<sub>3</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-CH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-C≡CH,  
 -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C≡CH, -CH(CH<sub>3</sub>)-CH(CH<sub>3</sub>)-C≡CH, -CH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)-C≡CH, -  
 C(CH<sub>3</sub>)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-CH(C≡CH)<sub>2</sub>, -C≡C-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C≡C-C≡CH, -C≡C-C≡C-CH<sub>3</sub>, -  
 CH(C≡CH)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡C-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-C≡CH, -CH<sub>2</sub>-C≡C-C≡C-CH<sub>3</sub>,  
 -C≡C-CH<sub>2</sub>-C≡C-CH<sub>3</sub>, -C≡C-C≡C-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C(C≡CH)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -C≡C-CH(CH<sub>3</sub>)-C≡CH, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C≡C-C≡CH,  
 -CH(C≡CH)-CH<sub>2</sub>-C≡CH, -CH(C≡CH)-C≡C-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-Ph, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-COOH, -NH-CO-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-  
 COOH, -NH-CO-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, -NH-CO-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, -NH-CH(COOH)-CH<sub>2</sub>-COOH, -NH-CH<sub>2</sub>-COOH,  
 -NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-COOH, -NH-CH(COOH)-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-COOH, -NH-CH(CH<sub>3</sub>)-COOH;

en donde preferentemente al menos uno de los sustituyentes R\*, R<sup>#</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup>,  
 R<sup>12</sup>, R<sup>13</sup> se selecciona de entre los siguientes sustituyentes:

-NH<sub>2</sub>, -OH, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -OPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -OPO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -COOH, -COO<sup>-</sup>, -CO-NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH-  
 CO-NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -N(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NH(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub><sup>+</sup>, -NHCH<sub>3</sub>, -NHC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -  
 NHC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup>, -NH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CO-COOH, -O-CO-NH<sub>2</sub>,  
 -C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-CS-NH<sub>2</sub>, -NH-COOH

Se prefieren también los compuestos de la fórmula general (III) como se muestra a continuación:



en donde los residuos X y L tienen los significados que aquí se divulgan.

De preferencia, los compuestos de fórmula general (I), (II) y (III) tienen un coeficiente de partición entre n-  
 octanol y agua (también conocido como K<sub>OW</sub> u octanol-agua-coeficiente de partición) de K<sub>OW</sub> < 6,30 (log K<sub>OW</sub> < 0,80),  
 preferentemente K<sub>OW</sub> < 1,80 (log K<sub>OW</sub> < 0,26), con mayor preferencia K<sub>OW</sub> < 0,63 (log K<sub>OW</sub> < -0,20) y más  
 preferentemente K<sub>OW</sub> < 0,40 (log K<sub>OW</sub> < -0,40).

Además, los compuestos de fórmula general (I), (II) y (III) tienen el mismo número preferido de átomos de  
 carbono como se ha descrito anteriormente, el mismo rango de pH preferido para la reacción de solubilización, la misma  
 proporción molar preferida de ácido carboxílico al compuesto de solubilización y las mismas condiciones de reacción  
 preferidas que se divulgan anteriormente para los compuestos de solubilización en general.

El coeficiente de partición es una proporción de concentraciones del compuesto no ionizado entre las dos  
 soluciones. Para medir el coeficiente de partición de los solutos ionizables, el pH de la fase acuosa se ajusta de tal  
 manera que la forma predominante del compuesto es no ionizado. El logaritmo de la proporción de las concentraciones  
 del soluto no ionizado en los solventes se denomina log P:

$$\log P_{\text{oct/agua}} = \log \left( \frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{agua no ionizada}}} \right)$$

El coeficiente de distribución es la proporción de la suma de las concentraciones de todas las formas del  
 compuesto (ionizado más no ionizado) en cada una de las dos fases. Para las mediciones del coeficiente de  
 distribución, el pH de la fase acuosa se amplifica a un valor específico de manera que el pH no se altere  
 significativamente con la introducción del compuesto. El logaritmo de la proporción de la suma de las concentraciones  
 de las diversas formas del soluto en un solvente a la suma de las concentraciones de sus formas en el otro solvente se

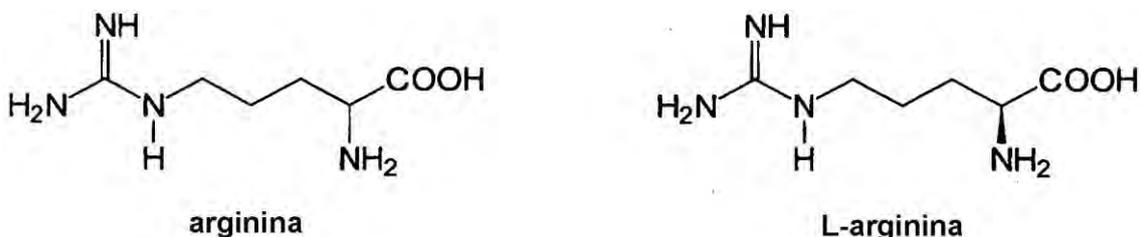
denomina log D:

$$\log D_{\text{oct/agua}} = \log \left( \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{agua ionizada}} + [\text{solute}]_{\text{agua neutra}}} \right)$$

Además, el log D es dependiente del pH, por lo tanto, el pH debe especificarse en el log D en que se midió. De particular interés es el log D a pH = 7,4 (el pH fisiológico del suero de la sangre). Para los compuestos no ionizables, el log P = log D en cualquier pH.

### Arginina

La arginina (ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico) es un ácido  $\alpha$ -amino. La cadena lateral de aminoácidos de la arginina consiste en una cadena lineal alifática de 3 carbonos, cuyo extremo distal está protegido por un grupo guanidinio complejo. Según la invención, puede usarse L-arginina, D-arginina, así como también racematos de los mismos.



Con un  $pK_a$  de 12,48, el grupo guanidinio está cargado positivamente en ambientes neutros, ácidos e incluso los más básicos y, por lo tanto, confiere propiedades químicas básicas a la arginina. Debido a la conjugación entre el doble enlace y los pares solitarios de nitrógeno, la carga positiva se deslocaliza, lo que permite la formación de múltiples enlaces H. La arginina puede protonarse con tres cargas adicionales, situadas en la cadena lateral ( $pK_a$  12,48), en el grupo amino ( $pK_a$  8,99) y en el grupo carboxilo ( $pK_a$  1,82)

La forma L es uno de los 20 aminoácidos naturales más comunes. En los mamíferos, la arginina se clasifica como un aminoácido semi-esencial o condicionalmente esencial, dependiendo de la etapa de desarrollo y el estado de salud del individuo. Los niños pequeños no son capaces de satisfacer sus necesidades y por lo tanto la arginina es nutricionalmente esencial para ellos.

La arginina es una molécula anfifílica con un grupo carboxi reactivo.

El valor teórico para el log  $P_{ow}$  (ver arriba) de la arginina es - 4,20. Para la arginina, el coeficiente de distribución es aproximadamente igual al coeficiente de partición, porque a pH = 7 la arginina está casi exclusivamente presente en la forma iónica. Libby et al. (Mol Pharmacol 1981, 20, 602-608) determinaron el log  $D_{ow}$  = - 4,08.

Al investigar la capacidad de solubilización de los ácidos grasos por los sistemas de aminoácidos acuosos, se encontró que la arginina disuelve completamente el ácido oleico mediante la formación de micro- y nano-emulsiones cuando se excede una proporción molar de 1:1 (arginina:ácido graso). Curiosamente, no es necesario ningún co-solvente para solubilizar los ácidos carboxílicos. Se observó la formación espontánea de una nano-emulsión a temperatura ambiente. El valor de pH después del auto-ensamblaje de una micro-emulsión 1:1 es aproximadamente 9,8. En las nano-emulsiones, se encontró que el tamaño de partícula era aproximadamente 2 nm de diámetro y no se encontraron conjuntos mayores que 25 nm. Este auto-ensamblaje de nano-partículas es una característica central de una nano-emulsión. La nano-emulsión es completamente transparente y estable durante más de 6 meses a temperaturas entre -20 y 100° C. La disminución del pH por adición de ácido (HCl) reduce la capacidad de solvatación que podría superarse mediante la adición de arginina. Sin embargo, el pH de la solución es crítico para la capacidad de nano-emulsificación de arginina, que disminuye por debajo del pH 8.

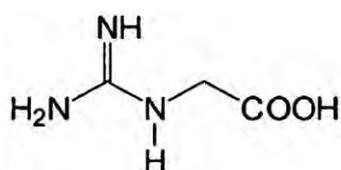
Sorprendentemente, se encontró que la arginina exhibe su capacidad de solubilización también en soluciones orgánicas. El ácido oleico y la albúmina en diversas concentraciones en una solución acuosa se investigaron mediante la adición de arginina. El exceso de ácidos grasos resulta en la difuminación de la solución. Mediante la adición de arginina este efecto puede ser revertido completamente. La diálisis de equilibrio se realizó con y sin arginina. Se pudo demostrar que la transferencia de ácidos grasos a través de una membrana de celulosa 5000D fue hasta 10 veces más alta cuando la arginina estaba en la solución del modelo. Las mismas investigaciones realizadas con plasma humano

mostraron resultados comparables (Ejemplo 1). La capacidad de la arginina para liberar los ácidos grasos ligados a la albúmina se investigó mediante ácido oleico marcado  $^3\text{H}$ . Sin arginina aproximadamente el 40% del ácido graso radiomarcado reside en la fase orgánica después de la extracción con n-hexano. La adición de arginina liberó los ácidos grasos. Sin embargo, una mayor concentración molar de arginina que la del ácido graso fue necesaria para alcanzar el efecto máximo. Pudo lograrse una reducción de los ácidos grasos residuales hasta 2%. La eficacia se mejoró cuando la temperatura se incrementó a  $38^\circ\text{C}$ , en comparación con la temperatura ambiente. Otros aminoácidos hidrófilos (lisina, asparagina, ácido asparagínico, glutamina, ácido glutámico, histidina), así como también los aminoácidos hidrofóbicos investigados por un procedimiento idéntico, produjeron también una reducción de los ácidos grasos residuales. Sin embargo, esta fue significativamente menor, en comparación con la arginina.

#### Derivados de la arginina como compuestos solubilizantes

El término "derivados de la arginina" se refiere a compuestos que tienen un grupo carboxi ( $-\text{COOH}$ ) y un grupo amidino ( $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-$ ) o grupo amidino sustituido separados por al menos un átomo de carbono o que tienen un grupo carboxi ( $-\text{COOH}$ ) y un grupo guanidino ( $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}-$ ) o un grupo guanidino sustituido separados por al menos un átomo de carbono. Los compuestos mencionados anteriormente de fórmula general (I) son también derivados de la arginina.

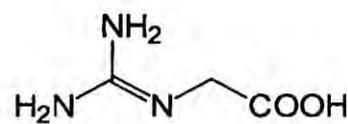
Ejemplos de derivados de arginina son por ejemplo el ácido amidinoacético, ácido amidinopropionico, ácido amidinobutírico, ácido guanidinopropionico, ácido guanidinobutírico, oligoarginina, poliarginina, así como también



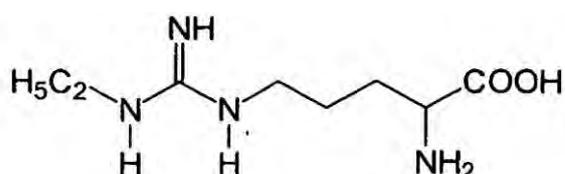
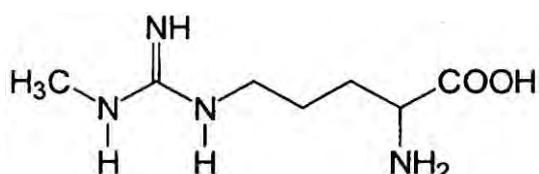
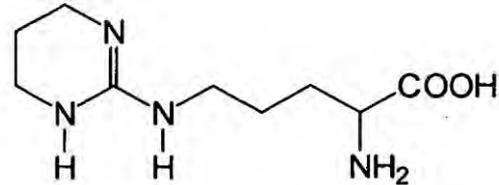
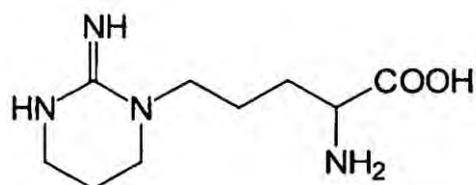
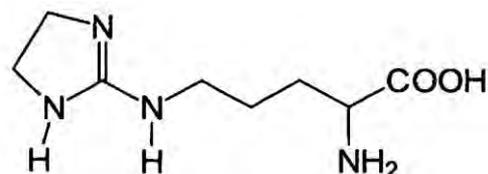
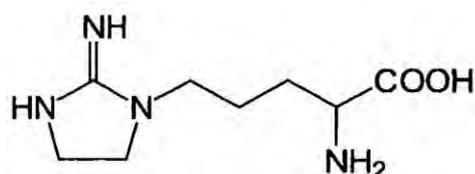
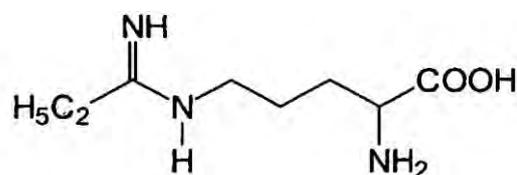
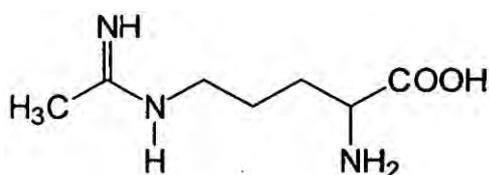
ácido guanidinoacético

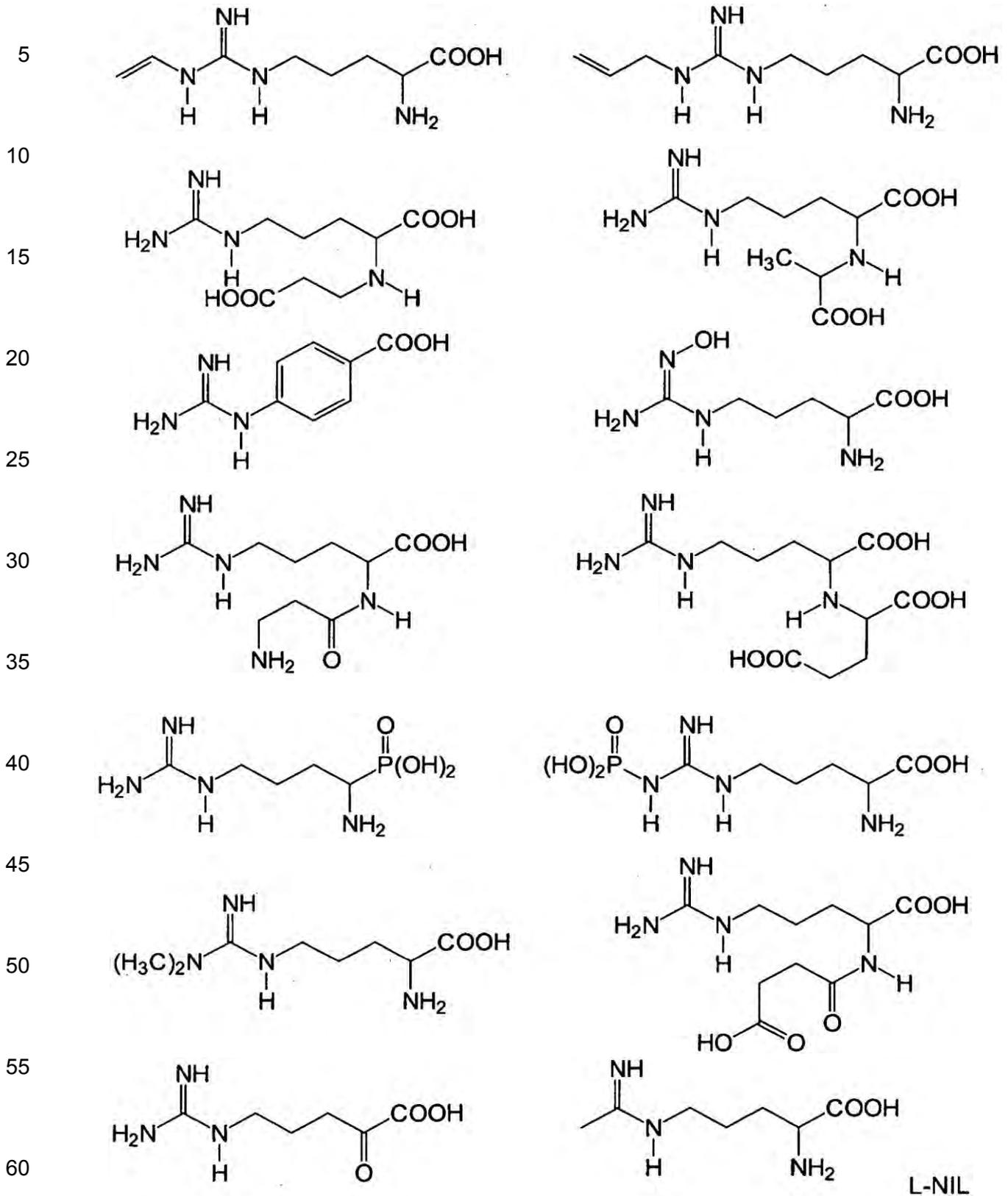


creatina



glicociamina





**Interacción de los ácidos carboxílicos y el compuesto de solubilización**

65 Según la invención, un método preferido para la eliminación de ácidos carboxílicos de soluciones acuosas u

orgánicas comprende los siguientes pasos fundamentales:

- a) Agregar el compuesto de solubilización a una solución que contiene ácidos grasos;
- b) Pasar la solución a lo largo de una superficie que lleva lipasas inmovilizadas o catalizadores capaces de liberar los ácidos grasos de sus formas esterificadas y que se implementa en un sistema capilar micro- o nano-fluido para obtener una completa interacción con los ácidos grasos esterificados;
- c) Pasar la solución a lo largo de una interfaz que consiste en una membrana de separación, un gel o un ensamblaje de capilares huecos
- d) Aplicar un gradiente a través de la interfaz de separación de fases por medio de un gradiente de concentración, un gradiente osmótico, un gradiente físico-químico, un gradiente de pH, un gradiente de neumático, un gradiente de temperatura, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos;
- e) Separar la fracción de ácido graso asociada con el compuesto solubilizante;
- f) Disolver los ácidos grasos en un medio aceptor; y
- g) Opcionalmente eliminar el compuesto de solubilización de la solución.

Por lo tanto, la capacidad de un compuesto de solubilización para construir micro y nano-emulsiones a partir de ácidos carboxílicos en medios acuosos u orgánicos es básica para la presente invención. Este principio fundamental se puede utilizar para una variedad de aplicaciones médicas, farmacéuticas, bioquímicas, industriales y ambientales que se describirán a continuación.

### Formulación de compuestos solubilizantes

El compuesto solubilizante se puede utilizar como solución pura, solución ajustada al pH o solución complejada. Se puede enlazar electrostáticamente o covalentemente a un péptido o proteína, así como también a una superficie o polímero orgánico o inorgánico cargado negativamente. El efecto solubilizante puede ser mejorado mediante la reducción de la fuerza iónica de la solución, emulsión o aceite que se va a tratar o analizar, por ejemplo, por medio de quelación, la diálisis o electrodiálisis para reducir la concentración de cationes. Además, puede ser útil para alterar la energía de ligamiento de un ácido carboxílico electrostático - interacción entre proteínas del ácido carboxílico que se va a purificar mediante el cambio de la energía de la superficie de la proteína o por tiolisación de enlaces de sulfuro, alterando con ello la conformación estérica de la proteína. Como se indica en los ejemplos, se pudo demostrar para un compuesto de solubilización tal como la arginina que hay una formación espontánea y estequiométrica de un aducto de arginina y sustancias hidrófobas ionizadas, en particular ácidos grasos, en circunstancias adecuadas. Resultan de esto mini-, micro- o nano-emulsiones.

Según la invención, estos ácidos carboxílicos mini-, micro- o nano-emulsionados se pueden separar, respectivamente extraídos de medios acuosos u orgánicos por

1. una adsorción de la sustancia que se va a separar en superficies tales como aerolitos, esferas, microsferas o ceolitas, particularmente si muestran características de superficie que les permiten enlaces electrostáticos o covalentes con la sustancia que se va a separar;
2. formación de complejos, es decir, formación de sales
3. una difusión de la sustancia que se va a separar en un medio aceptor (en particular organogeles);
4. una diálisis de la sustancia que se va a separar por medio de un gradiente térmico, eléctrico o físico-químico;
5. una filtración de la sustancia que se va a separar por medio de un gradiente térmico, eléctrico o físico-químico;
6. técnicas de destilación,
7. extracción supercrítica de líquido,
8. técnicas de separación nano-fluidicas.

### Hemodiálisis

La hemodiálisis es un procedimiento para purificar la sangre y es un método para el tratamiento de pacientes que sufren de disfunción renal. El principio de la diálisis es la difusión de solutos a través de una membrana semipermeable (ósmosis), en donde la sangre/plasma con toxinas solubles en agua, electrolitos, urea y otras sustancias está en un lado de la membrana (permeado) y una solución de diálisis que consiste en agua y una serie de electrolitos importantes en las concentraciones fisiológicas en el otro lado (dializado). Pequeñas moléculas tales como agua, electrolitos, urea y uratos se difuminan través de pequeños orificios en la membrana a lo largo del gradiente de concentración, pero no las proteínas y células de la sangre. En la hemodiálisis la sangre es bombeada desde el paciente, fluye a lo largo de la membrana en el dializador, y la sangre limpia (retinada) se bombea de nuevo al paciente. El flujo en contracorriente de la sangre y el dializado maximizan el gradiente de concentración de los solutos entre la sangre y el dializado.

La solución de diálisis se prepara mezclando una solución de concentrado de electrolitos y un sistema tampón con agua estéril desionizada (dializado). El dializado se calienta y se libera del gas. Hay básicamente dos sistemas de mezclado diferentes. En el sistema de mezcla volumétrica, dos bombas fijas ajustadas mezclan el concentrado y el agua de manera que la cantidad de flujo y la concentración de la solución de diálisis no cambien. La conductividad es una

medida de la concentración de electrolitos en la solución. Después de mezclar, se mide la conductividad de la solución y las bombas se ajustan a mano si es necesario para cambiar la cantidad de agua o concentrado.

5 Las máquinas de diálisis por lo general proporcionan las siguientes funcionalidades:

- aspiración de la sangre desde el paciente por medio de bombas de rodillos
- anti-coagulación
- procesos de transporte a través del dializador
- control de la velocidad de flujo del dializado y el filtrado
- 10 - control de gradientes de presión entre el dializado y la circulación del filtrado
- control de la conductividad
- ajuste de la fuerza iónica y el pH
- eliminación del aire atrapado y las partículas
- temperado de la sangre en recirculación
- 15 - recirculación de la sangre al paciente por medio de las bombas de rodillos

Los electrolitos, urea, creatinina, fosfato, aminoácidos, sustancias farmacológicas activas y el agua son capaces de pasar las membranas semipermeables, como se usa en la hemodiálisis.

## 20 B. Definiciones

"Dializador" significa un dispositivo que contiene una interfaz de separación de fases que permite la difusión y la penetración de los ácidos carboxílicos en una solución desde un lado de la interfaz de separación al otro en otra solución por medio de un gradiente físico y/o químico.

25 "Extractor" significa un dispositivo que contiene materiales que permiten la interacción física y/o química de los ácidos carboxílicos con una interfaz y con ello adsorbiéndolos y/o absorbiéndolos y/o complejándolos y/o separándolos.

30 "Vacíos capilares" son espacios abiertos continuos y lineales en forma tubular dentro de un material.

"Poroso" se refiere a las características de un material que tiene poros, aberturas o rebajes que permiten el paso de moléculas definidas de un compartimento a otro a lo largo de un gradiente. Estos poros, aberturas o rebajes pueden ser uniformes o diversos en tamaño, forma y distribución por todo el material, preferentemente una membrana.

35 El término "sangre" tal como aquí se menciona se refiere a la sangre, la sangre total, el plasma y el suero.

Se hace notar que el término "sangre" también puede referirse a los componentes sanguíneos y sustitutos de la sangre en la presente memoria.

40 El término componentes de la sangre tal como se usa en la presente memoria se refiere a los componentes celulares y acelulares, que comprenden glóbulos rojos y blancos, plaquetas, proteínas y péptidos, así como fracciones de lípidos.

45 El término "sustitutos de la sangre", como se usa aquí, se refiere a sustitutos de la sangre que pueden al menos parcialmente llevar oxígeno y expansores de volumen utilizados para aumentar el volumen de sangre que soporta la circulación sanguínea, pero que no pueden alcanzar la función fisiológica de la sangre.

50 El término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluidos los seres humanos. Se prefieren los seres humanos.

55 Los términos "primera entrada", "segunda entrada", "tercera entrada", "cuarta entrada", etc. han de entenderse como el número de entradas del dispositivo y no como el número de entradas de una parte del dispositivo, como una cámara del dispositivo. De este modo, "cuarto de entrada de la segunda cámara" no significa que la segunda cámara tiene cuatro entradas, sino que la segunda cámara tiene la entrada N° 4 del dispositivo.

El término micro-emulsión como se utiliza aquí se refiere a las características de una emulsión del compuesto solubilizante de la invención y un ácido carboxílico que comprenden al menos dos de los siguientes:

60 Auto-ensamblaje espontáneo, translucidez óptica, turbidez,  $< 1,1 \text{ cm}^{-1}$ ,  $> 80\%$  de micelas de  $< 200 \text{ nm}$  a  $25^\circ \text{ C}$ , estabilidad de la translucidez óptica en un rango de temperatura entre  $-40$  y  $99^\circ \text{ C}$ , estabilidad de translucidez óptica durante al menos 12 meses, tensión superficial  $< 60 \text{ dyn/s}$ .

El término nano-emulsión, como se usa aquí, se refiere a las características de una emulsión del compuesto solubilizante y un ácido carboxílico que comprenden al menos dos de los siguientes:

65

Auto-ensamblaje espontáneo, transparencia óptica, turbidez,  $< 0,4 \text{ cm}^{-1}$ ,  $>80\%$  de micelas de  $<100\text{nm}$  a  $25^\circ \text{C}$ , estabilidad de la transparencia óptica en un rango de temperatura entre  $-40$  y  $99^\circ \text{C}$ , estabilidad de la transparencia óptica durante al menos 12 meses, tensión superficial  $< 50\text{dyn/s}$

#### 5 C. Métodos para la separación y reacción de ácidos carboxílicos libres a partir de medios acuosos u orgánicos

La separación de los ácidos carboxílicos libres puede realizarse por métodos físicos o químicos, como se conoce en la técnica. Esto incluye pero no se limita a uno o una combinación de los métodos siguientes: adsorción, complejación, filtración, diálisis, evaporación, segregación por gravedad, electroforesis, electrolíticamente, electro-osmóticamente, electro-cinéticamente, osmóticamente, térmicamente, por un gradiente de concentración o por una reacción química.

Se prefiere que la separación se lleve a cabo por adsorción, filtración, diálisis, electrólisis, así como también complejación y segregación por gravedad.

#### 15 Métodos para utilizar el efecto nano-emulsionante

El efecto nano-emulsionante del compuesto solubilizante en ácidos carboxílicos permite su solvatación y la purificación en medio acuoso, permite su uso como un electrolito, permite reacciones químicas en medios acuosos, mejora la reactividad química, aumenta la capacidad de disolución de los ácidos carboxílicos para sustancias hidrofóbicas y lipófilas. La nano-emulsificación permite y respectivamente mejora la disolución y penetración de los ácidos carboxílicos en complejos moleculares, y los sólidos orgánicos o inorgánicos. Además, puede utilizarse para disolver los complejos de ácidos carboxílicos con moléculas apolares o anfífilas en medios orgánicos o emulsiones.

#### 25 Nano-emulsificación

El término nano-emulsificación se refiere a la formación de nano-emulsiones. Pueden utilizarse en una amplia variedad de aplicaciones. La solubilidad óptima de las dos fases en medios acuosos, la gran área de superficie entre las dos fases, así como también las dimensiones y estructuras geométricas de estas fases en el rango nanométrico las convierten en un vehículo versátil para disolver reactivos, productos químicos o farmacéuticos. Compuestos solubilizantes tales como la arginina o los derivados de la arginina han demostrado ser un valioso aditivo en varias comunicaciones que informan acerca de las nano-emulsiones. Sin embargo, el uso exclusivo de tales compuestos solubilizantes para la preparación de una nano-emulsión no ha sido documentado hasta la fecha.

#### 35 Métodos para la complejación y adsorción

Los ácidos carboxílicos que se han solubilizado en un medio acuoso se pueden procesar adicionalmente separándolos por medio de complejación o adsorción. En medios acuosos, los materiales para la complejación debe ser donantes de protones con una capacidad para construir sales con ácidos carboxílicos. Una realización preferida es el uso de sales de calcio.

Los adsorbedores se puede utilizar en medios hidrófilos o hidrófobos, pueden tener propiedades hidrófilas o hidrófobas, estar presente en forma disuelta o inmovilizados sobre un material de soporte. Los materiales que se van a utilizar se indican a continuación (5. Aceptor-/adsorbente-moléculas/materiales). En una realización preferida, se utiliza carbono, arginina inmovilizada o calcio. Para la adsorción o complejación de los ácidos grasos, puede ser necesario protonizarlos en un medio acuoso orgánico o desprotonizarlos en un solvente orgánico. De esta manera, pueden ser fácilmente adsorbidos en un medio acuoso orgánico o solvente. Una realización preferida es el uso de n-hexano, triglicéridos o colesterol.

#### Métodos para utilizar procedimientos de separación fluido-fluido

El efecto de solubilización se puede usar además para separar los ácidos carboxílicos de los medios orgánicos por medio de una extracción fluido-fluido, como se conoce en la técnica. El principio de este método es la separación espontánea o impulsada de las fases acuosa y orgánica. Para separar o eliminar los ácidos carboxílicos disueltos dentro de la fase orgánica, se mezcla una solución acuosa que contiene el compuesto de solubilización con la fase orgánica. Esta mezcla puede llevarse a cabo utilizando diversos medios físicos como sacudimiento, agitación, vibración, sonificación, calentamiento, burbujeo, vapor, así como también por medio de la dinámica laminar o turbulenta de los fluidos. Los ácidos carboxílicos solubilizados son arrastrados con el medio acuoso, con lo que se separan y concentran en la solución acuosa. La separación de fases puede lograrse por medio de la gravedad, que puede forzarse por medios físicos como la centrifugación o sonificación. Para la extracción de los ácidos carboxílicos separados de este modo, la solución acuosa u orgánica se separa por métodos estándar. Los ácidos carboxílicos disueltos pueden separarse por acidificación de la solución y extracción con un solvente orgánico. A la inversa, los ácidos carboxílicos disueltos en un solvente orgánico puede transferirse o liberarse a un medio acuoso por extracción con el compuesto solubilizante. Este método se puede utilizar para la preparación y análisis o aplicarse a plantas industriales de gran escala.

#### 65 Métodos electrocinéticos y electroforéticos

Una realización preferida es la separación electroforética de los ácidos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos son electrolitos débiles. Su fuerza iónica corresponde a su CMC en un sistema acuoso debido a su partición baja. Los detergentes iónicos y aniónicos han demostrado aumentar la partición mediante la reducción de la CMC. Sin embargo, una fuerza iónica superior se alcanza solo por medio de surfactantes iónicos o la presencia de contra-iones. En teoría, un contra-ión que impide la micelización daría lugar al mismo tiempo a una partición óptima y una partición aún mejor cuando la constante de disociación del ligamiento del par iónico es alta. No existen análisis detallados de la partición de los ácidos carboxílicos en nano-emulsiones. Sorprendentemente, se ha encontrado que los compuestos solubilizantes presentan estas propiedades. Además, solubilizan los ácidos carboxílicos y permiten una movilidad electroforética inesperadamente alta de los ácidos carboxílicos. Es probable que la adherencia más baja entre las cadenas de carbono de los ácidos carboxílicos durante la interacción con dicha molécula sea responsable de la movilidad observada. Por lo tanto, la nano-separación de los compuestos solubilizantes y los ácidos carboxílicos permite su electroforesis en medios acuosos o medios orgánicos. Además, estos compuestos solubilizantes hacen que los ácidos carboxílicos sean adecuados para los procedimientos de separación y análisis electroforético, como se conoce en la técnica. Una realización preferida es el uso en electroforesis en gel. Los hidro- o organogeles son adecuados. La detección de los ácidos carboxílicos separados electroforéticamente se puede hacer mediante el uso de un cromóforo inorgánico, es decir, cromato (254 nm), molibdato (230 nm) o ácidos aromáticos con cromóforos UV fuertes, es decir, ácido ftálico, trimelítico, piromelítico, benzoico, piridindicarboxílico, cúprico-acetato-piridina y 4-aminobenzoato, mediante técnicas conocidas en la técnica.

Otra realización preferida es el uso de electro-ósmosis, -diálisis y -filtración. Los ácidos carboxílicos presentan la tendencia a formar micelas en medio acuoso, como se dijo antes. En los solventes orgánicos, se mueven libremente. Sin embargo, puesto que se protonan en solventes orgánicos, el movimiento electrocinético no es posible. Cuando están presentes como sal en un medio acuoso, la motilidad electroforética es deficiente. Además, aunque los ácidos carboxílicos son generalmente moléculas pequeñas debido a la formación de micelas, pasan los medios de filtración sólo en una pequeña cantidad. Este hallazgo se agrava debido al hecho que los materiales de filtro disponibles son hidrófilos o hidrófobos. Estas propiedades, no obstante, no son ideales para la partición de los ácidos carboxílicos. Por lo tanto, la electro-ósmosis, -diálisis, -filtración es ineficaz para este propósito.

Sorprendentemente, el uso de un compuesto solubilizante conduce a la micro- o nano-separación de los ácidos carboxílicos y permite su separación por medio de ósmosis, diálisis, filtración, destilación o extracción con fluido supercrítico utilizando un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente eléctrico, un gradiente físico-químico o una combinación de éstos. En una realización preferida, se usa una membrana de separación organófila. Dichas membranas deben tener una alta proporción de moléculas orgánicas cuando se utilizan para la ósmosis o diálisis, o la superficie de los canales de filtro debe exhibir un alto contenido de moléculas lipófilas.

Sin embargo, los medios de separación que exhiben tales propiedades no existen. Sorprendentemente, el inventor ha encontrado que la capacidad de transporte y la selectividad para los ácidos carboxílicos se puede aumentar mediante la selección de moléculas en la superficie de los medios de separación, mientras se reducen las dimensiones de los poros/canales.

Se cree que el mecanismo del procedimiento de la invención es la combinación de dichos efectos: es decir, la partición alta de ácidos carboxílicos y la alta tasa de disociación de la arginina o los otros compuestos solubilizantes permiten un movimiento rápido en el campo eléctrico. El flujo electrocinético que ocurre dentro de los nano-canales puede aumentar aún más la capacidad de transporte electroforética.

#### Métodos de nano-filtración

Los ácidos carboxílicos tienen un bajo peso molecular y pequeñas dimensiones. Por lo tanto, son principalmente adecuados para la nano-filtración. Sin embargo, la baja concentración de ácidos carboxílicos libres en un medio acuoso hace que la nano-filtración sea ineficaz. Además, las membranas selectivas de sustancias hidrófobas o lipófilas son inadecuadas o no existen. La solubilización de los ácidos grasos de la invención incrementa la fracción de ácidos carboxílicos libres y permite su nano-filtración. En los últimos años, las membranas de nano-filtración están disponibles comercialmente. Sin embargo, sus superficies son hidrófilas, lo que las hace inadecuadas para los ácidos carboxílicos. La hidrofobización de las superficies de los canales tuvo sólo un efecto limitado en sus tasas de filtración. Dado que la nano-filtración ofrecería ventajas decisivas sobre el uso de membranas de micro- o ultra-filtración, como mayor especificidad de sustrato o aumento del flujo, se han hecho esfuerzos para mejorar la partición de los ácidos carboxílicos en los nano-canales. Por lo tanto, la funcionalización superficial de los nano-canales tuvo el propósito de hacerlos lipófilos. Este objetivo podría lograrse por varias clases moleculares: aminoácidos, polipéptidos y ácidos carboxílicos (véase el capítulo E, 4. Materiales para la funcionalización superficial).

Por lo tanto, una realización preferida es el uso de una membrana de nano-filtración que tiene una superficie funcionalizada que exhibe bajas propiedades hidrófilas (ángulo de contacto de agua  $>100^\circ$  a  $25^\circ$  C) y altas propiedades lipófilas (ángulo de contacto del ácido oleico  $<10^\circ$  a  $25^\circ$  C). La media de anchura del canal debe estar en el rango de 5 a 100 nm, más preferentemente entre 10 y 50 nm. La longitud del canal debe estar en el rango de 0,1 a 10  $\mu$ m, más preferentemente entre 2 y 5  $\mu$ m. Los materiales que se pueden usar se enumeran a continuación (Capítulo E, 3.3 Materiales para membranas de separación).

Los materiales preferidos son óxido de aluminio, óxido de titanio, carbono, policarbonato, polietileno, silicatos.

En una realización preferida, la funcionalización superficial debe estar precedida por el recubrimiento monocapa de la superficie del canal con un polímero adecuado para reaccionar con las moléculas utilizadas para la funcionalización, lo que se denomina capa de conexión, y moléculas que se conectan a esta capa determinando las propiedades superficiales, lo que se denomina capa de funcionalización.

#### 1. Capa de conexión

Esta capa actúa como una interfaz entre el material de soporte determinado y la capa de funcionalización. Puede ser necesaria para introducir o activar las estructuras moleculares primero en el material de soporte. La capa de conexión debe cubrir completamente la superficie, que debe ser lisa después del procesamiento. Debe haber un recuento denso de los grupos reactivos apropiados para la reacción con las moléculas de la capa de funcionalización. Sin embargo, un recubrimiento multicapa definido puede ser aconsejable con el fin de dar forma a las estructuras del canal. Esto se puede lograr mediante polímeros, como se indica a continuación (Capítulo E, 3.3 Materiales para membranas de separación).

Una realización preferida es el uso de polímeros tales como APTS, acrilato de pentafluorofenilo (PFA), metacrilato de pentafluorofenilo (PFMA), poli-N-trimetil-aminoetil metacrilato (PTMAEMA) y poli (2-dimetilamino) etil metacrilato (PDMAEMA).

#### 2. Capa de funcionalización

Esta capa tiene por objeto lograr condiciones de superficie definidas.

La condición de superficie preferida resultante de la suma de las fuerzas intermoleculares de Coulomb, van der Waals, los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrófoba de la funcionalización de superficie tiene un efecto lipófilo neto que permite la partición de los ácidos carboxílicos. La interposición de los grupos cargados que crea una carga de superficie, que puede ser positiva o negativa, se utiliza en una realización preferida. Otra realización preferida es la institución de una fuerza de superficie lipófila o hidrófoba que va de 2 a 20 nm, mientras que tiene una carga de superficie positiva o neutra. Moléculas adecuadas pueden ser los ácidos carboxílicos, aminoácidos, péptidos, proteínas, amidas ternarias o cuaternarias, hidrocarburos aromáticos o ciclodextrinas. (Véase Capítulo E, 4. Materiales para la funcionalización de superficie).

En una realización preferida, los ácidos grasos, alanina, fenilalanina, arginina, lisina, amidina o guanidina se utilizan como grupo funcional central dentro de una estructura molecular.

Por lo tanto, se puede usar a un panel de separación de ultra- o nano-filtración para diálisis, filtración o nano-filtración de ácidos carboxílicos que se funcionaliza con una o más de las sustancias de fórmula general (I) o (II) comprendiendo al menos una capa de funcionalización y, opcionalmente, una capa de conexión.

### D. Aplicaciones del procedimiento de solubilización de la invención

#### Diálisis de los ácidos grasos de la sangre

La diálisis es un procedimiento estándar en medicina, analítica y en la industria química o farmacéutica. El procedimiento se utiliza para reducir o eliminar sustancias a partir de una solución ingresada por un paso impulsado por gradientes a través de una interfaz. La interfaz se compone principalmente de una membrana porosa que permite el paso de moléculas hasta un tamaño definido. Las membranas disponibles varían en sus propiedades hidrófilas e hidrófobas. Sin embargo, el paso de los ácidos carboxílicos libres sólo es posible en cantidades mínimas. Una razón de ello es que la cantidad de ácidos grasos libres es pequeña, incluso en presencia de altas concentraciones de detergentes, ya que las micelas están todavía presentes resultando en un tamaño de partícula que no permite su paso a través de los poros de la membrana. Este problema puede superarse por la formación de una micro- o nano-emulsión de la invención. El método de la invención puede llevarse a cabo mediante una modificación de la diálisis convencional de la sangre, por ejemplo, el sistema sanguíneo de un sujeto se acopla al dializador a través de tubos. Alternativamente, una cierta cantidad de sangre se toma como muestra, se procesa en un dializador modificado de acuerdo con el método de la invención y después se reinyecta en el paciente. En el último caso, el volumen de la muestra de sangre tomada está en el rango de 10 ml a 0,5l, preferentemente entre 100 y 500 ml, más preferentemente entre 300 y 500 ml.

Hay que destacar que todos los métodos divulgados en la presente invención pueden realizarse in vivo, es decir, en el cuerpo humano y animal e in vitro, es decir, no en el cuerpo humano y animal.

En una realización preferida, el método de la invención se utiliza para eliminar los ácidos grasos libres de la sangre de un sujeto que lo necesita. Por lo tanto, hay aplicaciones médicas y científicas de este método. Se proporciona un dializador, respectivamente, el extractor que aplica el principio inventivo descrito anteriormente a la sangre del sujeto. Para este fin, el dispositivo se acopla a la circulación arterial o venosa de un mamífero, preferentemente un ser humano, por medio de cánulas, catéteres y tubos. En algunas realizaciones, puede usarse en la presente memoria una máquina de diálisis comercialmente disponible, por ejemplo, Plasmal futura<sup>®</sup> (BBraun Melsungen, Alemania). La sangre aspirada por la máquina a través de una vía venosa o arterial o que se obtiene de una muestra de sangre puede ser bombeada a

la unidad de diálisis (ver dibujos esquemáticos en la Fig. 2: 213), por medio de una bomba de rodillos (212), ya sea antes o después de la hemoseparación. La unidad de diálisis consta de dos subunidades que están interconectadas por tubos apropiados (por ejemplo, Fresenius, Lifeline® Beta SN Set SRBL-R, Alemania). La primera subunidad se compone de un dializador, como se describe a continuación (para una descripción detallada véase la sección Diálisis/Procedimientos de extracción). La sangre aspirada por la máquina de diálisis puede ser pretratada por medio de diálisis y/o anticoagulación de citrato (202) como se conoce en la técnica, o someterse a un procedimiento de hemoseparación o una secuencia de estos pasos del procedimiento. La sangre (plasma) preparada es bombeada por la máquina de diálisis a la entrada del dializador (203) junto con una infusión constante de la solución de arginina o cualquier otra solución de un compuesto solubilizante por medio de una bomba de infusión (214) desde un saco de almacenamiento (215) que contiene una solución estéril del compuesto solubilizante, tal como la arginina. La concentración final del compuesto solubilizante en el dializado se puede calcular a partir del flujo de sangre (plasma) actual y la concentración de este compuesto en la solución de infusión. En el caso de la arginina, se apunta a una concentración final de 100 a 300 mmol/l. Cuando se disuelve en la cámara de distribución del dializador (para descripciones detalladas véase la sección Diálisis/Procedimientos de extracción), la mezcla del compuesto solubilizante – solución de sangre (plasma) pasa a las membranas de fibras huecas permitiendo condiciones micro- o nano-fluídicas. En un modelo, se usa una disposición de capilares de cámara huecos con un diámetro típico de 200 µm y una longitud de 30 cm. El volumen de sangre (plasma) dentro del medio de separación es 40-80 ml, preferentemente 50-60 ml. El material de la misma puede ser orgánico, inorgánico o combinaciones de ambos. Los materiales que pueden ser utilizados se resumen en la lista de material de la interfaz (véase el Capítulo E, 3.4 Capilares porosos huecos). La interfaz membranosa tiene micro- o nano-poros que se funcionalizan molecularmente. La funcionalización y propiedades de la superficie, los poros y los canales se describen más adelante (véase el Capítulo E, 4. Materiales para la funcionalización de la superficie). La duración del paso de la solución ingresada debe ser preferentemente entre 20 a 60 s, más preferentemente entre 30 y 40 s. La duración de contacto resultante entre la solución ingresada y la interfaz debe permitir una eliminación completa de los ácidos grasos solubilizados. El ensamblaje de estos cartuchos de filtro se conoce en la técnica. El líquido de la diálisis se perfunde a través de la entrada de dializado. Llena el espacio entre el exterior de las fibras huecas y la pared interior del cartucho. La dirección de perfusión es opuesta a la del flujo de ingreso y se llama flujo transversal en la técnica. La velocidad de perfusión típica del líquido de diálisis está en el mismo rango que la del líquido de ingreso. Sin embargo, podría ser necesario variar las proporciones de la tasa de flujo, que podrían estar típicamente entre 1:2, 1:1, 2:1 ó 3:1, dependiendo de la concentración de lípidos en la solución de ingreso. El líquido de diálisis sale del cartucho a través del cono de salida y se transfiere a una unidad de circulación secundaria que se describe a continuación.

La sangre (plasma) sale del dializador por recogida en la cámara de recogida y se transfiere a través de tubos adecuados a la segunda unidad. La segunda unidad consiste en un dializador estándar utilizado para la hemodiálisis (201). La sangre (plasma) es conducida a través de los capilares de cámara huecos dentro del dializador permitiendo el equilibrio de concentración de las moléculas hidrófilas de bajo peso molecular y los electrolitos en contra de la solución de diálisis (210) que se bombea por medio de una bomba de rodillos (216) y penetra en el espacio entre la superficie exterior de las fibras y la superficie interior del cartucho. El dializado sale del dializador estándar por una salida y se recoge en un depósito de residuos (211). La concentración, respectivamente, la fuerza iónica del dializado y el pH son regulados por la máquina de diálisis. El plasma purificado se combina con las células de la sangre que han sido separadas (no se representa en la Figura 2). La sangre purificada se bombea por medio de una bomba de rodillo (212) de vuelta al paciente a través del sistema de catéter antes mencionado.

#### Unidad de circulación secundaria

Como se dijo antes, la solución dentro de la circulación secundaria, denominada aquí solución de aceptor, debe tener una alta capacidad para ligar los ácidos grasos que han pasado a través de la interfaz del dializador (203) y lograr la convección de los mismos a un dispositivo de extracción secundaria (204) adicional, lo que aquí se denomina módulo de intercambio de ácidos grasos. La solución de aceptor (véase el Capítulo E, 7. Soluciones de aceptor) dentro del circuito secundario puede ser una solución acuosa con un aceptor orgánico o inorgánico (véase el Capítulo E, 5. Aceptor-/Adsorbente-Moléculas/Materiales). Las moléculas aceptoras pueden disolverse en forma libre o inmovilizarse a ceolitos o superficies adsorbentes (véase el Capítulo E, 4. Materiales para la funcionalización de la superficie). Preferentemente, se debe utilizar una solución de proteínas purificadas de ligamiento de ácidos grasos de origen humano o de producción sintética como aceptor de ácidos grasos en la circulación secundaria. La solución de aceptor de la circulación secundaria se mueve mediante una bomba (205), preferentemente una bomba de rodillos. La solución de aceptor cargada con ácidos grasos sale del dializador a través de la salida de filtrado por aspiración de una bomba de rodillos (205) y se envía a la entrada del módulo de intercambio de ácidos grasos (204) a través de un tubo adecuado y se perfunde a través de la cámara de intercambio común llena de el granulado de extracción. La solución de aceptor se purifica al pasar por el granulado de extracción, luego sale del módulo de intercambio por el puerto de salida y entra en un tubo que está conectado con el dializador en la entrada de la cámara de filtración.

El módulo de intercambio de ácidos carboxílicos (véase la Figura 3) consiste en un cartucho que presenta dos entradas y dos salidas situadas en lados opuestos del cartucho cilíndrico. La entrada (301) y la salida (303) de la circulación secundaria están cubiertas por un embudo de filtro (305) que tiene un tamaño de poro por debajo del rango más bajo del granulado de extracción de la circulación de intercambio. La entrada (302) y la salida (304) para la circulación terciaria son lo suficientemente grandes como para permitir un flujo de entrada y salida de baja presión del

material de extracción granuloso. Dentro del módulo de intercambio, la solución de intercambio de la circulación secundaria está en contacto inmediato con el granuloso de extracción de la circulación terciaria. La perfusión del módulo de intercambio con la solución de la circulación secundaria y con el granuloso de la circulación terciaria se dirige en dirección opuesta una de la otra. La solución de aceptor refrescada del circuito secundario sale a través de la salida (303) del módulo de intercambio y es conducida a la conexión de entrada de filtrado del dializador a través de un tubo.

#### Circulación terciaria

La circulación de extracción terciaria se mueve mediante una bomba (véase la Figura 2: 205) adecuada para el uso del material de extracción granuloso. Preferentemente, puede usarse una bomba de doble cilindro (207). La introducción de aire en la circulación se reduce por llenado simultáneo del sistema con pequeñas cantidades de solución de aceptor purificada por medio de una comunicación a través de un tubo que conecta la bomba con la salida del módulo de intercambio. Un puerto de derivación de la bomba permite el llenado simultáneo del sistema. El material de extracción disuelto en la solución de aceptor es empujado hacia adelante a través de un tubo que está conectado con la entrada del módulo de intercambio de ácidos grasos. El aire residual transportado dentro de este segmento se elimina mediante una trampa de aire (208) montada en la parte superior de un puerto de escape de aire (217). El puerto está sellado con una placa de filtro que no permite el paso del material de extracción. Después de pasar por el módulo de intercambio, el material de extracción sale del cartucho a través de la salida de la circulación terciaria. Esta salida está conectada con un tubo que se puede fijar en posición vertical situado sobre el módulo de intercambio y el recipiente de almacenamiento para la solución de aceptor (209). Este tubo está interconectado con el recipiente de almacenamiento que se sella con una placa de filtro que no permite el paso del material de extracción (218). Sin embargo, se permite que la solución de aceptor fluya de regreso dentro de este tubo al nivel hidrostático aproximado del plano de llenado del recipiente de almacenamiento. El material de extracción es empujado hacia adelante a través del tubo hacia un recipiente (206). El recipiente es parte de un sistema de limpieza para la purificación del material de extracción. La purificación puede operarse por medios físicos o químicos. El proceso de purificación es seguido por una etapa de limpieza final utilizando agua estéril. El material de extracción purificado se recoge luego en un segundo recipiente que está conectado con la bomba de la circulación terciaria.

Alternativamente, para purificar el material de extracción en una circulación terciaria, el material de extracción fresco puede ingresarse desde un depósito y descargarse en otro depósito después del paso del módulo de intercambio utilizando los mismos tubos como se describe antes.

Según la invención, el procedimiento antes mencionado o partes del mismo pueden combinarse con técnicas estándar en hemoterapia como la diálisis, hemoperfusión, hemofiltración, hemodiafiltración, separación plasmática centrífuga, aféresis plasmática, filtración en cascada y termo-filtración.

Aquí la eficacia de la separación se aumenta mediante hidrólisis adicional de los ácidos grasos esterificados, mejoramiento de la lipólisis y/o el uso de un sitio de aspiración sanguínea venosa central para la purificación de la sangre

De este modo, una realización especialmente preferida de la presente invención es eliminar los ácidos carboxílicos y en especial los ácidos grasos de la sangre mediante el uso de los compuestos de solubilización que aquí se divulgan y preferentemente la arginina y los derivados de la arginina. El método más común para la purificación de la sangre es la diálisis, que también se puede utilizar para eliminar de la sangre los ácidos grasos y también los ácidos grasos ligados a la albúmina.

#### **Formulaciones de fluidos solubilizantes para uso humano**

En una realización preferida, la solubilización de los ácidos grasos se consigue mediante el uso de un compuesto solubilizante. Puede ser aplicado en su forma pura o en una solución ajustada al pH con HCl u otros ácidos aceptables para su uso en seres humanos. El rango de pH preferido es 7,5 a 10,0, más preferentemente entre 8,0 y 9,0. Puede ser ventajoso utilizar un aditivo como un co-solvente o tampón, como se indica a continuación (véase el Capítulo E, 8. Aditivos para las preparaciones de arginina o sus análogos). Un aditivo preferido es el ácido ascorbínico.

#### Uso clínico

El método de la invención para la solvatación y la extracción de ácidos grasos de la sangre humana puede ser aplicado mediante técnicas estándar como lo sabe una persona experta en la técnica y pueden ser parte de un procedimiento de hemodiálisis que se lleva a cabo en un paciente que lo necesita debido a insuficiencia renal o hepática. El uso de este procedimiento puede estar señalado también en otras indicaciones. Las indicaciones médicas incluyen, entre otros, diagnósticos o condiciones tales como diabetes mellitus, síndrome metabólico, sobrepeso, obesidad, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, hipercolesterinemia, hiperuricemia, celulitis, aterosclerosis, hígado graso, lipomatosis, extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular, fibrilación supraventricular. Una realización preferida es un sitio de acceso venoso para la aspiración y la recirculación de la sangre. El sitio de aspiración debe estar dentro del sistema venoso central, más preferentemente dentro de la vena cava inferior. La sangre purificada podría ser devuelta al paciente a través del mismo sitio de acceso que tiene el orificio distal a las aberturas del sitio de aspiración.

Esto se lleva a cabo en los sistemas de catéter comercialmente disponibles como BioCath (Bionic Medizintechnik, Friedrichsdorf, Alemania). El sistema de acceso debe tener un tamaño francés entre 8 y 14, más preferentemente entre 10 y 12. El sitio de acceso venoso más preferido es la vena femoral.

Las conexiones y llenado de los tubos debe llevarse a cabo como se hace en hemodiálisis y ser se conocimiento de los expertos en la técnica. La anti-coagulación terapéutica es obligatoria mientras se realiza el procedimiento. Esto se puede hacer por co-infusión de la heparina o las heparinas de bajo peso molecular con una dosis como para lograr el bloqueo terapéutico de la vía extrínseca de coagulación sanguínea, medida por el tiempo parcial de tromboplastina activado o probando la actividad anti-factor-Xa, respectivamente, como es conocido por los expertos en la técnica. Alternativamente, puede usarse la administración de citrato con el fin de complejar iones de calcio para la anti-coagulación de la sangre dentro del sistema de hemodiálisis. Este procedimiento se obtiene mediante máquinas de diálisis como Multifiltrate (Fresenius, Medical Care, Alemania). El calcio complejado se dializa por una etapa de hemodiálisis inicial. Durante el procesamiento ulterior, la sangre no se puede coagular. Antes de transferir la sangre purificada al paciente, una dosis predefinida de una infusión que contiene los iones de calcio se administra conjuntamente a la corriente sanguínea, restableciendo la coagulación.

De acuerdo con el hallazgo de la invención que muestra que la fracción de extracción del procedimiento se puede aumentar mediante la estimulación de la lipólisis en una persona tratada de esta manera, se prefiere aplicar fármacos que inducen la lipólisis como agonistas de los receptores adrenérgicos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , inhibidores de la fosfodiesterasa-III, agonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , nitróxido o donantes de nitróxido, lipasa sensible a las hormonas, leptina, péptido natriurético, vasopresina, heparina y análoga, tirosina, yohimbina.

Además, la estimulación de la lipólisis de la invención se relaciona con mejoras regionales de la actividad lipolítica por medio de la infiltración subcutánea local de los medicamentos lipolíticos antes mencionados, así como anestésicos, liposomas, incluyendo los fosfolípidos, vasodilatadores, incluyendo la histamina. El aumento adicional de la lipólisis se puede lograr mediante estimulación del campo eléctrico o aplicando ultrasonido o energía de ondas puls.

Los compuestos solubilizantes tales como la arginina, al igual que otras moléculas pequeñas solubles en agua, pasan fácilmente las membranas hidrófilas de diálisis. A pesar de no ser tóxicos, la eliminación de la alta concentración no fisiológica de arginina de la sangre/plasma por una diálisis final utilizando un dializador estándar (de alto o bajo flujo) es preferida. Una diálisis final asegura el restablecimiento de una concentración fisiológica de electrolitos, osmolaridad y pH.

Puede ser útil para aumentar la concentración de albúmina en la sangre, los fosfolípidos o ciclodextrinas con el fin de aumentar la capacidad de transporte de los ácidos grasos no esterificados durante el procedimiento.

Durante tal tratamiento combinado, un estrecho control de los parámetros hemodinámicos (presión arterial, frecuencia cardíaca, temperatura, oxigenación de hemoglobina), así como los parámetros metabólicos (glucosa en sangre, pH, sodio y potasio), es obligatorio. La duración de un episodio de tratamiento depende de los parámetros clínicos. Típicamente, un procedimiento tarda entre 3 y 12 hrs., más preferentemente la duración es de entre 4 y 6 horas. La cantidad de ácidos grasos extraídos depende de la selectividad de la membrana de filtración utilizada hacia los ácidos grasos patógenos. La cantidad preferida de ácidos grasos extraídos está entre 100 y 2000 ml, más preferentemente entre 500 y 1500 ml.

El procedimiento de purificación para el uso clínico se puede realizar como un método de diálisis, filtración, adsorción, precipitación o combinaciones de estos.

#### **Extracción a gran escala de ácidos grasos libres en la industria**

Los ácidos carboxílicos libres se encuentran con frecuencia en soluciones o emulsiones producidas o utilizadas en plantas de gran escala. Por ejemplo, los ácidos grasos están presentes en los aceites vegetales en bruto, en la cáscara y la vaina de frutas y verduras de maíz; en la biomasa o aguas residuales; en aceite mineral en bruto, o surgir durante el procesamiento, así como en los suelos que contienen aceite; en el aceite residual y la grasa eliminada. En la mayoría de los casos, los procedimientos físicos se utilizan para eliminar estos ácidos carboxílicos que requieren una alta demanda de energía. En algunos casos, el procedimiento de separación tiene consecuencias no deseadas en el producto purificado. Por ejemplo, los aceites de refinamiento se exponen al vapor para destilar los ácidos grasos volátiles. Durante tal procedimiento, la exposición al calor puede conducir a la transisomerización de los ácidos carboxílicos esterificados. Esto es un peligro potencial para el consumidor. Por lo tanto, es conveniente evitar tales procedimientos.

Se encontró que esta tarea puede resolverse por el procedimiento de la invención.

Según la invención, estas soluciones acuosas u orgánicas que se van a purificar derivan de plantas, organismos, materiales fósiles, mezclas de reacción naturales o sintéticas.

Una realización preferida es la purificación de los aceites de ácidos carboxílicos libres por adición de soluciones acuosas de al menos un compuesto de solubilización, según se divulga aquí, tales como los compuestos de fórmula general (I) o la arginina o análogos de la arginina y mezclas de tales compuestos (Fig. 4). El aceite que se va a depurar se vierte desde un tanque de almacenamiento (402) en un tanque de reacción (401). Una cantidad predefinida de una solución concentrada del compuesto solubilizante desde un tanque de almacenamiento (403) se añade al tanque de reacción. Preferentemente, la solución se mezcla por medio de un sistema de mezclado (411). Después, la mezcla se bombea (bomba 412) a un depósito de recogida (405) donde la fase acuosa y la fase oleosa se separan de forma espontánea a través de la gravedad. La fase acuosa inferior contiene los ácidos carboxílicos que se disipan en la micro-

o nano-emulsión que se elimina continuamente a través de la salida en el sitio más bajo del tanque. Alternativamente, la mezcla se transfiere a una centrífuga o un separador de membrana. Este procedimiento se puede repetir si se exige un mayor grado de purificación. Se ha demostrado que es ventajoso calentar ligeramente las soluciones mientras se mezclan con el fin de lograr la integridad del proceso de solubilización. El proceso de mezclado se acelera mediante la aplicación de ondas de sonar. Cuando la mezcla se transfiere a través de un separador de membrana, resulta ventajoso utilizar principalmente membranas selectivas de aniones. El aceite purificado (fase triglicérido) por lo general no contiene ningún compuesto de solubilización después de la eliminación del agua. Sin embargo, para los aceites altamente purificados, puede ser útil repetir el lavado con agua o utilizar adsorbentes de cationes. La fase triglicérido purificada a partir de la fase superior del depósito de recogida se elimina continuamente a través de una salida situada en el sitio superior del depósito y se transfiere a un tanque de almacenamiento de triglicéridos (404). La solución acuosa se bombea desde la parte inferior del depósito de recogida (405) en un segundo tanque de reacción (406). Una cantidad predefinida de ácido se añade desde un depósito de almacenamiento de ácido (407). La solución en el tanque de reacción se mezcla por medio de un sistema de mezclado (411). Después de esto, la solución mixta se bombea (412) en un segundo tanque de separación (408). Los ácidos grasos y compuestos de solubilización solubilizados en agua se dejan separar por gravedad. Sin embargo, otros medios de separación conocidos en la técnica se pueden utilizar en su lugar. Los ácidos grasos purificados que se concentran en la parte superior del segundo tanque de separación se transfieren constantemente a un depósito de almacenaje de ácidos grasos (409). La solución acuosa del compuesto solubilizante que se concentra en la parte inferior del segundo tanque de separación se bombea continuamente a una unidad de electrodiálisis (410). La electrodiálisis puede aplicarse con el fin de eliminar los cationes y/o aniones mediante técnicas y dispositivos como los conocidos en la técnica y por medio de membranas selectivas de iones (413). La solución purificada del compuesto solubilizante se bombea al tanque de almacenamiento del compuesto de solubilización (403). Un compuesto de solubilización preferido para este propósito es un derivado de la arginina y en especial la arginina.

Como alternativa a la separación por gravedad, los ácidos carboxílicos solubilizados dentro de la fase acuosa pueden ser separados por procedimientos que utilizan electroforesis, filtración neumática o nano-filtración, inmovilización, agregación, destilación o transferencia de fase por medio de un solvente orgánico. En una realización preferida, se usa la adsorción de los ácidos carboxílicos volátiles por carbono, complejación con calcio, transferencia de fase por el uso de solventes orgánicos, electrodiálisis y organo-nano-filtración. Una realización preferida es el uso de esterasas cuando se utiliza el procedimiento de la invención en el tratamiento de los desagües o la producción de biodiesel (véase el Capítulo E, 2. Hidrolasas). Su uso combinado aumenta la efectividad y la integridad de la eliminación de componentes orgánicos, respectivamente aceitosos, o la reactividad química.

Para la realización de los métodos de la invención, los ácidos carboxílicos pueden estar presentes en una solución y se añade al menos un compuesto de solubilización de fórmula general (I) o (II).

Alternativamente, los ácidos carboxílicos se añaden a una macro-, micro- o nano-emulsión que contiene al menos un compuesto de solubilización de fórmula general (I) o (II) con el fin de utilizar dicha emulsión para liberar, complejizar, separar, reaccionar, agregar, complejizar, coagular, flocular, sedimentar o separar los complejos que contienen ácidos carboxílicos.

Estos métodos de la invención pueden usarse para inicializar, aumentar, mantener o disminuir una reacción química o físico-química, lo que permite mejorar la captación y transporte de los productos o componentes de la reacción en procesos de reacción biológica o química, separar, solubilizar, liberar, lograr la convección, transportar las sustancias mediante captación de la vesícula, o que permite o mejora la penetración de los ácidos carboxílicos emulsionadas a través de medios hidrófilos o anfífilos o sólidos.

Las aplicaciones industriales preferidas incluyen

- la eliminación de los ácidos grasos de las soluciones que contienen ácidos grasos derivadas de aceite crudo o el procesamiento de combustible. Particularmente en la producción y procesamiento de aceites minerales y combustibles, respectivamente, en los biocombustibles, puede aplicarse el método de la invención.
- la eliminación de los ácidos grasos de las soluciones que contienen ácidos grasos derivadas del procesamiento industrial de alimentos. En particular, en la producción de aceites comestibles, el procesamiento de maíz, arroz y salvado de suero, verduras, así como también leche y pescado, alimentos bajos en grasa y productos libres de grasa y aceite que contiene o produce organismos, respectivamente, este método será útil.
- la eliminación de los ácidos grasos de soluciones que contienen ácidos grasos derivadas del procesamiento de compuesto biorgánicos que contienen aguas residuales, o en aguas residuales industriales. Por ejemplo, para el procesamiento de las aguas residuales de biorreactores, puede aplicarse este método.
- la eliminación de los ácidos grasos de soluciones orgánicas o acuosas que contienen ácidos grasos derivadas de la limpieza de productos industriales como la lana, el algodón u otros productos textiles, en el procesamiento de aguas residuales de limpiezas industriales como plantas de tanques, cisternas, lavados de coches, mataderos, entre otros.
- la eliminación de los ácidos grasos en procesamientos químicos o farmacéuticos, como preparación de adhesivos o pinturas.
- la eliminación de sustancias de ácidos no carboxílicos que se agregan o adhieren a ácidos carboxílicos solubilizados, de ese modo co-solubilizando y separándose o eliminándose junto con la sustancia solubilizante

y los ácidos carboxílicos que van a ser utilizados en la purificación de grasas y aceites crudos de origen mineral u orgánico, a fin de eliminar fosfolípidos complejantes, glicolípidos, esteroides, pesticidas que ya se solubilizan o inmovilizan a materia orgánica o inorgánica.

- la eliminación de sustancias adhesivas, ligadas o complejadas mediante macro-, micro-, o nano-emulsiones de sustancias solubilizantes y ácidos carboxílicos para la extracción de semillas orgánicas de aceite, arenas o rocas aceitosas y depósitos grasos.

#### **Aplicación para el análisis de ácidos grasos en soluciones acuosas**

El análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos carboxílicos es una tarea engorrosa. Los ácidos carboxílicos con una longitud de cadena de carbono superior a 6-10 en función de la presencia de sustituyentes hidrófilos o hidrófobos no se puede medir en medios acuosos, la que impide su medición por electroforesis o conductimetría. Además, el análisis puede verse obstaculizado por la disolución incompleta de los ácidos carboxílicos de los compuestos orgánicos, incluso cuando se han usado solventes orgánicos. Se realiza el análisis estándar con cromatografía de gases (GC). Sin embargo, los ácidos carboxílicos tienen que ser metilados para ser adecuado para la GC, lo que hace este método consume tiempo y sea susceptible a fallos metodológicos. Estas dificultades se pueden superar mediante el procedimiento de solvatación de la invención.

Según la invención, este método también se puede utilizar para el análisis cualitativo y cuantitativo del contenido de ácidos grasos en soluciones acuosas. También es adecuado para la diferenciación del contenido relativo de ácidos grasos esterificados y no esterificados.

Una realización preferida del procedimiento de solvatación de la invención es su uso para el análisis de ácidos carboxílicos por electroforesis, conductimetría y espectrometría.

#### Preparación de muestras analíticas

Las mezclas de aceite y ácido graso, así como también mezclas con agua, como por ejemplo emulsiones de aceite en agua (o/w) y agua en aceite (w/o), se transfieren a una cámara de reacción. Se añade una solución con un compuesto de solubilización. Para la determinación de los ácidos grasos esterificados, las esterasas se pueden añadir antes, junto con o después de la adición del compuesto solubilizado con el fin de liberarlas. Las soluciones deben incubarse. Demostró ser útil para calentar moderadamente el volumen de muestra, reducir la fuerza iónica o reducir el pH antes de la adición del compuesto solubilizante. Se pueden realizar los análisis siguientes

- con la solución en su estado actual,
- por medio de precipitación de los ácidos carboxílicos libres,
- por medio de extracción con un solvente orgánico.

El uso de los analitos resultantes con los métodos analíticos estándar se describe a continuación.

#### Procedimiento de electroforesis en gel

Para el análisis de los ácidos carboxílicos por electroforesis en gel, el analito acuoso puede tomarse en su forma actual o como filtrado de electro-nano-filtración o diálisis disolviéndose con el compuesto de solubilización como una micro- o nano-emulsión. Puede usarse un dispositivo estándar para la electroforesis en gel (por ejemplo, BIOTEC-FISCHER GmbH, PHERO-vert 1010-E) y un gel de SDS-poliacrilamida. Puede ser útil añadir solventes próticos, tales como etanol, al analito. En una realización preferida, se usa un organogel (véase 6. Organogeles). La calibración y la lectura se puede realizar según se conoce en la técnica.

#### Destilación

Una solución que contiene ácidos grasos no esterificados solubilizados en una solución acuosa del compuesto solubilizante puede purificarse mediante una destilación de uno o dos pasos. Esto se puede hacer mediante el calentamiento y vaporización de la solución a presión atmosférica o en condiciones de vacío con el fin de reducir la temperatura de evaporación de los ácidos grasos que se van a destilar. Una realización preferida es el uso de un evaporador de película delgada (Normag, aparato Roatafil).

#### Procedimiento de precipitación/complejación

La precipitación o complejación de ácidos carboxílicos solubilizados se puede realizar como se ha descrito antes y según se conoce en la técnica. A saber, métodos tales como la complejación con iones metálicos o ciclodextrinas son preferidos. El precipitado tiene que ser extraído y lavado con agua como se conoce en la técnica. El precipitado purificado se disuelve luego en un ácido fuerte (HCl, ácido acético, ácido carbónico) hasta la disolución completa y la protonación de los ácidos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos se extraen luego con un solvente orgánico (n-hexano, éter dietílico, cloroformo, entre otros). La fase orgánica se elimina cuidadosamente y se procesa para

análisis posteriores.

Un método de análisis preferido es la cromatografía líquida.

#### Procedimiento de extracción de solventes

5

10

15

La extracción de ácidos carboxílicos de medios no sensibles a la acidificación o la exposición a solventes orgánicos se puede realizar directamente desde un medio acuoso. El uso del compuesto solubilizante tiene la ventaja decisiva de que la condición de extracción no tiene que ser tan drástica comparada con los procedimientos de extracción de solventes únicos. Esto se logra con los ácidos carboxílicos que se van a extraer disolviéndose en la fase acuosa mediante el procedimiento de solvatación de la invención. La acidificación cuidadosa en presencia de una fase de solvente orgánico impulsa los ácidos carboxílicos protonados a pasar a la fase de solvente sin la necesidad de mezclado riguroso del solvente y el medio. Luego, la extracción de solventes se realiza como se conoce en la técnica. La solución de solvente puede ser utilizada para NIR- o IR, o espectrometría IR lejana o directamente cromatografía líquida.

#### Procedimiento de electro-nano-filtración/difusión

20

25

30

35

40

Otro método de análisis preferido es la filtración o difusión impulsada electroforéticamente o electrostáticamente por separación para ser utilizada con la solubilización de la invención (Fig. 5). La solución/emulsión de material orgánico o inorgánico se prepara mediante la solubilización antes mencionada. El valor pH debe ser ajustado a valores > 6,0, preferentemente a valores entre 8 y 11. A continuación, volumen de muestra definido se transfiere a la cámara donante/lote de reacción del dispositivo analítico. Esta cámara donante (503) se dispone entre una cámara llena de catolitos (502) y una cámara de separación (505). La cámara donante/lote de reacción y la cámara de catolitos están separadas por una membrana (504). Preferentemente, esta membrana es selectiva de iones. La cámara de separación se llena con un cromatóforo (por ejemplo, un gel, preferentemente un organogel). Alternativamente, puede consistir en un sistema microfluídico o una membrana funcionalizada de nano-filtración o difusión como se describe más adelante (véase el Capítulo E, 3. Membranas, y 4. Materiales para la funcionalización de la superficie) (510). En el otro lado del separador de membrana, se dispone una cámara/recipiente de aceptor (508) que se llena con una solución de arginina o una solución de cualquier otro compuesto de solubilización. Esta cámara/recipiente de aceptor es adyacente a una cámara/recipiente adicional (507) que sirve para recibir el anolito. Estas cámaras/recipientes están separados por una membrana (506). Alternativamente, el panel de separación es un organogel lleno en un capilar. Preferentemente, la membrana es selectiva de iones. Al aplicar voltaje entre el cátodo (501) y el ánodo (509), los compuestos de ácidos carboxílicos ionizados presentes en la cámara/recipiente donante, particularmente los ácidos grasos, como aniones, son conducidos a través de la cámara/membrana de separación y por lo tanto transferidos a la cámara/recipiente de aceptor. La solución en la cámara/recipiente de aceptor puede ser analizada inmediatamente. Preferentemente, el análisis se lleva a cabo por métodos de conductimetría, espectroscopia o detección de masa. Alternativamente, se añade un agente adicional (por ejemplo, un indicador, un agente derivador) y se produce el análisis. Anolitos y catolitos adecuados son la solución de arginina, soluciones de derivados de la arginina, HCl, entre otros. La adición, mezcla y transferencia de los agentes se lleva a cabo preferentemente en un sistema microfluídico. Esto es particularmente adecuado para el desarrollo de un sistema de análisis "electrónico miniaturizado".

45

50

Las aplicaciones prácticas son análisis médicos-bioquímicos de contenidos de ácidos grasos de los fluidos corporales tomados como muestra de un sujeto. Dicho análisis puede servir como criterio de diagnóstico. Los diagnósticos médicos incluyen, entre otros, aterosclerosis, hipertensión, diabetes mellitus, obesidad, hiperlipoproteinemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia renal. Las aplicaciones científicas incluyen el uso en química, bioquímica, farmacia, farmacología, ciencia de los materiales, biología, procesamiento industrial de alimentos. Este método de análisis también puede ser utilizado en aplicaciones industriales como se describe en el párrafo anterior en extracción a gran escala de los ácidos grasos libres.

#### **Dispositivos y procedimientos de diálisis/extracción**

55

Para llevar a cabo la solubilización de la invención y la separación de los ácidos carboxílicos en un medio acuoso u orgánico con un compuesto de solubilización de fórmula general (I) o (II), un dializador/extractor integrado debe comprender los siguientes componentes esenciales que son fundamentales, cualquiera que sea su aplicación:

60

65

- i) Una primera cámara para la reacción del medio acuoso u orgánico que contiene el ácido carboxílico con el compuesto de solubilización de fórmula general (I) o (II);
- ii) Una segunda cámara para la recepción de los ácidos carboxílicos solubilizados;
- iii) Un panel de separación entre dicha primera cámara y dicha segunda cámara que comprende una membrana de separación o un ensamblaje de capilares huecos, y
- iv) Medios para la conducción de dicha solución reactiva desde dicha primera cámara a dicha segunda cámara a través de dicho panel de separación mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente físico-químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de éstos.

Este dispositivo se puede utilizar para la terapia médica, análisis médico, análisis de alimentos, procesamiento de alimentos, procesamiento de aceite, procesamientos químicos y farmacológicos y farmacéuticos, análisis en la industria o ciencia farmacéutica o química, eliminación de ácidos carboxílicos de aguas residuales de las limpiezas privadas, comerciales o industriales, eliminación de ácidos carboxílicos de procesos de biorreactores, limpiezas de materias sólidas oleosas, organogelación o nano-emulsificación de ácidos carboxílicos.

Para el uso de tal dispositivo, se aplica un método con los siguientes pasos clave:

- i) Proporcionar la solución o emulsión o suspensión que contiene los ácidos carboxílicos;
- ii) La adición de al menos cantidades equimolares de al menos un compuesto solubilizante;
- iii) Separar los ácidos carboxílicos solubilizados a partir de la solución o emulsión o suspensión por separación de fases, filtración, nano-filtración, diálisis, absorción, complejación, destilación y/o extracción.

Más específicamente, el paso iii) se logra preferentemente por medio de uno de los siguientes métodos de separación o una combinación de ellos:

pasando los ácidos carboxílicos por separado o junto con al menos un compuesto solubilizante a través de una membrana de separación o un tubo o un ensamblaje de capilares huecos aplicando un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente físico-químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos, o realizando la separación de fases mediante la combinación de dos o más separaciones de fases de construcción de medios, o

pasando los ácidos carboxílicos junto con al menos un compuesto solubilizante a través de una interfaz de separación de fases que permite el paso de dichos ácidos carboxílicos y al menos dicho compuesto de solubilización mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente físico-químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos, en donde la interfaz de separación de fases consiste en un gel, un organogel o un material sólido o una combinación de éstos, o filtrando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o nano-filtrando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o dializando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o adsorbiendo los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o complejando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o destilando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o separando los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización por extracción con fluido supercrítico.

En el paso de separación, el gel y/o los materiales sólidos pueden ser de origen orgánico o inorgánico y pueden ser porosos o no porosos.

De acuerdo con la invención, dicho método se utilizará en los siguientes campos: terapia médica, análisis médicos, análisis de alimentos, procesamiento de alimentos, procesamiento de aceite crudo, análisis de aceites, procesamiento de combustible, modulación de reacciones químicas o físico-químicas, solubilización de moléculas poco solubles, procesamientos químicos y farmacológicos o farmacéuticos, análisis en la industria o ciencia farmacéutica o química, eliminación de ácidos carboxílicos de aguas residuales de limpiezas privadas, comerciales o industriales, eliminación de ácidos carboxílicos de procesos de biorreactores o suelos o plantas, limpieza de materiales sólidos aceitosos, organogelación o nano-emulsificación de ácidos carboxílicos. Dichos métodos analíticos pueden ser cuantitativos o cualitativos.

En una forma más específica, los dispositivos comprenden las siguientes partes:

- a) Una primera cámara de reacción del medio acuoso que contiene el ácido carboxílico con el compuesto de solubilización, que tiene una primera entrada para dicho medio acuoso que contiene el ácido carboxílico;
- b) Un recipiente para dicho compuesto solubilizante, que tiene una segunda entrada para el llenado de dicho recipiente con dicho compuesto solubilizante y que se conecta con dicha primera cámara vía una tercera entrada;
- c) Una segunda cámara para recibir la solución que contiene ácido carboxílico dializado/filtrado;
- d) Un panel de separación entre dicha primera cámara y dicha segunda cámara que comprende una membrana de separación o un ensamblaje de capilares huecos, y
- e) Medios para conducir dicha solución reactiva desde dicha primera cámara a dicha segunda cámara a través de dicho panel de separación mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente eléctrico, un gradiente físico-químico, o combinaciones de los mismos.

Opcionalmente, también puede comprender los siguientes componentes:

- f) Medios para eliminar los asociados del ácido carboxílico y el compuesto solubilizante de dicha solución filtrada

por medio de la eliminación de dicha solución filtrada a través de la convección de una solución de aceptor que se ingresa a través de una cuarta entrada en dicha segunda cámara y que puede fluir hacia fuera a través de una primera salida de dicha segunda cámara, y

g) Medios para eliminar la solución purificada de dicha segunda cámara a través de una segunda salida.

Tal dializador/extractor integrado es adecuado para llevar a cabo la solubilización de la invención y la separación de los ácidos carboxílicos en un medio acuoso u orgánico en una amplia gama de aplicaciones médicas e industriales. Estos componentes clave forman la pieza central de los dispositivos diseñados para aplicaciones específicas. Las realizaciones específicas para aplicaciones particulares se describen en más detalle a continuación.

Cabe señalar que todas las entradas, salidas y medios de transporte pueden tener dispositivos de ajuste para controlar el flujo respectivo o tasas de transferencia. Estos dispositivos de ajuste no se nombran expresamente para cada dispositivo mencionado en la presente. Todos los dispositivos de ajuste conocidos en la técnica serán adecuados.

Sujeto a la invención está también un método que aplica los pasos claves para la solubilización y separación de los ácidos carboxílicos en un medio acuoso u orgánico mediante el uso del dializador/extractor integrado mencionado anteriormente. El núcleo de los métodos de la invención está representado por los siguientes pasos:

- a) Preparación de dicha solución mediante la reducción de la fuerza iónica por medio de la complejación, adsorción, separación o diálisis de cationes ligados y no ligados;
- b) Ajuste del pH de la solución por medio de la adición de un ácido o una base;
- c1) Ajuste de la molaridad del compuesto de solubilización en el rango de 1:10 a 20:01 en comparación con la concentración estimada de los ácidos carboxílicos que se van a solubilizar; y
- d) Adición de dicho compuesto solubilizante en forma sólida o en una solución a dicha solución acuosa u orgánica que contiene el ácido carboxílico para generar una micro- o nano-emulsión.

Opcionalmente, el método también puede comprender cualquiera de los siguientes pasos:

- a1) liberación de ácidos carboxílicos ligados por complejación o ligamiento covalente
- c2) Si el compuesto de solubilización se administra en una solución, ajustar el pH de dicha solución con el fin de optimizar las condiciones de compatibilidad y reacción con los ácidos carboxílicos que se van a solubilizar por medio de acidificación o alcalización;
- e) Adición de esterasas, hidrolasas o un reforzador complejo;
- f) Adición de agua y/o un co-solvente a la solución, y/o
- g) Optimización de las condiciones de reacción por medio de calentamiento y/o mezcla de la solución, generando con ello una micro- o nano-emulsión mejorada.

En la descripción anterior de los dispositivos y métodos de la invención, así como en las siguientes modificaciones y realizaciones, no todas las funciones tienen que ser incluidas, respectivamente, no todos los pasos tienen que llevarse a cabo, algunos de ellos son opcionales. Además, en algunas realizaciones, algunas de las características o pasos se modifican, respectivamente desplazados según las correspondientes características o pasos. Por lo tanto, la secuencia de los pasos del método respectivo tiene que ser leída primero en orden alfabético. En segundo lugar, el afijo numérico es decisivo. Por ejemplo, si un paso c y un paso c1 está presente, el paso c1 se llevará a cabo después del paso c. En otras palabras, el paso c1 se intercala entre el paso c y el paso d. De forma análoga, si un paso c1 y un paso c2 están presentes en un método, esto significa que el paso c1 tiene que llevarse a cabo antes del paso c2. En otras palabras, el paso c1 se intercala entre los pasos b y c2. Si en una realización, un paso se modifica, respectivamente, se reemplaza en comparación con la realización antes mencionada, puede ocurrir que, por ejemplo, en cada realización, se indique un paso diferente g. La secuencia de estos pasos alternativos tiene que ser leída en el orden alfabético correcto. Así, si un paso g modificado está presente en el listado de pasos, esto significa, por supuesto, que un paso g de otra realización no está incluido en la presente realización. En el caso que se incluyan pasos opcionales, los pasos pueden ser presentados en un orden no alfabético. Esto no cambia la línea para entender la secuencia de los pasos en un orden alfabético. Lo mismo se aplica para las modificaciones en los dispositivos respectivos.

En realizaciones en las que al menos dos cámaras se proporcionan, el listado de los pasos del método de la invención puede complementarse de la siguiente manera:

- g2) Conducir la solución reactiva desde una primera cámara a una segunda cámara a través de un panel de separación usando la técnica de nano-filtración mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de éstos.

Opcionalmente, los pasos siguientes pueden estar comprendidos en estas realizaciones:

- f) Eliminar los asociados de ácido carboxílico y compuesto de solubilización de la solución filtrada a través de la convección de una solución de aceptor que se conduce a través de una entrada a dicha segunda cámara y que

puede fluir fuera a través de una salida de dicha segunda cámara; y  
g) Eliminar la solución purificada de dicha segunda cámara a través de una salida adicional.

5 Los pasos g2), h) e i) se pueden realizar después del paso f) como se describió anteriormente. Una aplicación muy importante del método de la invención es la purificación de la sangre de un paciente de ácidos grasos volátiles.

Por lo tanto, el dializador/extractor integrado respectivo tiene las siguientes modificaciones, respectivamente características adicionales (Fig. 6):

- 10 f) Medios para conducir la sangre o plasma de dicho sujeto a dicha primera cámara (610) de un dializador (603) a través de dicha primera entrada;  
g) Un sistema de bombeo y un sistema de mezcla (602) que permite ingresar el compuesto de solubilización de dicho recipiente (601) y mezclar la solución;  
15 h) Opcionalmente dicha primera cámara contiene materiales de soporte (604) en que las hidrolasas son inmovilizadas con el fin de liberar los ácidos grasos esterificados;  
i) Un primer panel de separación entre dicha primera cámara de un segundo dializador y la segunda cámara de un primer dializador, que comprende una membrana de separación (605) o un ensamblaje de capilares huecos;  
j) Medios para conducir la solución que contiene el ácido carboxílico desde dicha primera cámara del primer dializador a una segunda cámara del primer dializador mediante la aplicación de un gradiente de concentración,  
20 un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos;  
k) Medios para bombear (606) dicha solución filtrada desde dicha segunda cámara a una primera cámara de un segundo dializador (607);  
l) Medios para eliminar los asociados de ácido carboxílico y compuesto solubilizante que pasan a través de dicho segundo panel de separación del segundo dializador (607) por medio de una circulación terciaria;  
25 m) Un recipiente de almacenamiento de la solución de aceptor;  
n) Medios para bombear (612) la solución de aceptor de ácido carboxílico desde dicho recipiente de almacenamiento de la solución de aceptor (609) a dicha segunda cámara del segundo dializador;  
o) Medios para eliminar la solución de aceptor de ácido carboxílico cargada a un recipiente de residuos (608);  
p) Medios para reconducir la solución purificada que contiene el compuesto de solubilización que sale de dicha primera cámara del segundo dializador a la entrada de dicha segunda cámara del primer dializador, y  
30 q) Medios para reconducir las fracciones de sangre reunidas que salen de la primera cámara del primer dializador en la circulación del sujeto (611).

35 En otras realizaciones preferidas, una diálisis estándar de la sangre precede y/o supera los pasos del método de la invención. La ventaja es la combinación de una diálisis de sangre convencional como a menudo se realiza en pacientes con insuficiencia renal con una purificación especial de la sangre de los ácidos grasos volátiles en un solo procedimiento.

40 El método respectivo para la aplicación de tal dializador/extractor para purificar una muestra de sangre *ex vivo* de los ácidos grasos volátiles incluye las etapas adicionales, respectivamente modificaciones:

- g1) Liberar los ácidos grasos esterificados en la sangre de un sujeto por hidrolasas inmovilizados sobre materiales de soporte en el interior de dicha primera cámara generando así una micro- o nano-emulsión;  
45 h) Bombear la solución filtrada desde dicha segunda cámara a una primera cámara de un segundo dializador;  
i) Conducir la solución que contiene el ácido carboxílico desde dicha primera cámara del segundo dializador a una segunda cámara del segundo dializador a través de un segundo panel de separación mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos;  
50 j) Eliminar los asociados de ácido carboxílico y compuesto de solubilización que pasan a través de dicho segundo panel de separación por medio de una circulación terciaria;  
k) Bombear la solución de aceptor de ácido carboxílico desde un recipiente de almacenamiento de la solución de aceptor en dicha segunda cámara del segundo dializador;  
l) Eliminar la solución de aceptor de ácido carboxílico cargada en un recipiente de residuos, y  
55 m) Reconducir la solución purificada que contiene el compuesto de solubilización que sale de dicha primera cámara del segundo dializador a la entrada de dicha segunda cámara del primer dializador.

60 Una interfaz de separación de fases se compone de membranas porosas, geles con o sin vacíos o tubos con paredes porosas. La configuración de la membrana puede ser plana o redonda, procesada en lotes, colas o módulos. Los tubos pueden ser singulares o con canales múltiples. En una realización preferida, se usan capilares de cámara huecos. Estos tienen diámetros entre 100 y 300  $\mu\text{m}$  y una longitud entre 200 y 400 mm. El número de capilares de cámara huecos ordenados en paralelo depende de la tasa de flujo sanguíneo (plasma) que se pretende. Típicamente, el número de capilares dentro de un dializador está entre 10.000 y 40.000. La duración del contacto de la sangre (plasma) con la pared del capilar debe estar entre 2 y 50 segundos.

65 El material de interfaz puede consistir en materiales inorgánicos u orgánicos, o una combinación de ambos. Los materiales se enumeran a continuación (véase el Capítulo E, 3. Membranas). Una realización preferida es el uso de un

material de soporte cerámico, polimérico, metálico o de carbono. Más preferido es el óxido de aluminio y el policarbonato. La arquitectura del material puede ser simétrica o asimétrica, como se conoce en la técnica. Los canales/espacios/vacios de intersección pueden tener una configuración geométrica o aleatoria. Los diámetros del canal puede variar considerablemente, no obstante, deben estar en un rango que permita la ultra-, micro- o nano-filtración. Un realización preferida es el uso de una membrana de nano-filtración como se ha descrito antes (véase el Capítulo Métodos de nano-filtración).

En principio, las mismas membranas se pueden utilizar para filtración, diálisis u ósmosis. Sin embargo, las membranas para diálisis u ósmosis tienen que ser más selectivo, respectivamente selladas. El uso de un gel anidado en dichas estructuras de soporte se utiliza en otra forma realización preferida. Tales geles pueden consistir en componentes hidrófilos o organófilos o ambos. Los geles que exhiben auto-ensamblaje y muestran vacíos nano-estructurados o estructuras de canal después de la formación, respectivamente, la extracción de solventes, se utilizan en una realización preferida.

Un extractor usado para materiales biológicos, alimentos, solución de residuos, o uso industrial puede tener diferentes dimensiones de los componentes mencionados anteriormente, sin embargo el ensamblaje básico es el mismo.

La concentración de ácidos carboxílicos en soluciones consideradas para el procesamiento analítico o purificación puede variar en gran medida. Para la solubilización óptima, debe ajustarse una proporción de (compuesto solubilizante: ácido carboxílico) 1:01 a 4:01 dependiendo del pH y la fuerza iónica. Una proporción más baja dará lugar a una solubilización incompleta, una proporción más alta podría interferir con el procesamiento adicional. Sin embargo, el contenido de ácidos carboxílicos puede ser completamente desconocido. Este problema puede ser superado monitoreando la turbidez de la solución acuosa, respectivamente emulsión. Las emulsiones son turbias y las mini-emulsiones exhiben turbidez cuando se irradian con luz UV. Las micro- y nano-emulsiones son ópticamente transparentes. Sin embargo, por medio de la turbidez nefelométrica usando multihaz, pueden detectarse partículas unitarias de 1 hasta 1000 nm. Por lo tanto, el avance de la solubilización puede controlarse por la medición de la turbidez. Para una aplicación individual, será posible calcular la cantidad de compuesto solubilizante que tiene que ser añadida si se alcanza una transparencia definida para lograr la proporción deseada entre el compuesto de solubilización y los ácidos carboxílicos que se van a resolver. En caso de que partículas que no sean micelas de un ácido carboxílico estén presentes en la solución que se va a solubilizar, puede ser ventajoso filtrar las partículas o centrifugarlas.

Por otro lado, se puede usar también un uso menos sofisticado del proceso de solubilización. La mayoría de los compuestos solubilizantes tales como la arginina muestran una toxicidad mínima. Además, ya que son concentraciones no fisiológicas altamente solubles de los mismos, pueden eliminarse por una etapa de diálisis conocida en la técnica. Por lo tanto, puede elegirse un ajuste fijo de la concentración obtenida durante el proceso de mezcla. Esta concentración debe estar en el rango de 100 a 1000 mmol/l, el ajuste de una bomba de infusión que suministra el segmento de mezcla con la solución del compuesto solubilizante puede calcularse a partir del caudal de sangre (plasma) y la concentración prevista.

Un esquema típico de un dializador/extractor integrado se muestra en la Figura 7. El módulo consta de un cartucho cilíndrico (701). Una cámara de reacción (702) situada en el lado de la entrada está separada de la cámara de separación (703) que es el plano de sellado A. (704) La cámara de reacción puede albergar diversos sistemas para la mezcla de fluidos. El ejemplo muestra láminas onduladas (705). La cámara de reacción tiene una entrada separada para el compuesto solubilizante (712).

Un haz capilar (706) que comprende capilares de membrana huecos está empotrada en ambos extremos en un compuesto de sellado a fin de sellarlas. Los capilares de membrana están incrustados en un compuesto de sellado del plano de sellado A y B (704, 707), abiertos con sus extremos hacia la cámara de reacción (702) y la cámara de recogida (708), respectivamente. Los planos de sellado están sellados de manera que la cámara de separación (703) se separa. Ambos extremos de la carcasa cilíndrica están encerrados por una tapa que lleva una entrada/salida con una clavija de conexión (709). El alojamiento tiene una entrada/salida adicional (710, 711) que interseca la pared de la carcasa en la proximidad de ambos planos de sellado que se comunican con la cámara de separación. Los tubos de entrada/salida se cierran en una clavija de conexión (no aparece). El material de la carcasa y de sellado puede estar formado por un polímero como PU, PA, PE.

Otro método para la purificación de la sangre es la hemo-filtración. Por lo tanto, la sangre que se va a purificar es presurizada por medio de un sistema de bombeo de rodillos y un limitador de válvula/flujo hacia abajo del extractor. Dependiendo de la fracción deseada de filtrado, una presión de transmembra de hasta 500 mm Hg puede ajustarse, la que se calcula por la fórmula

$$P_{\text{flujo de entrada}} + P_{\text{flujo de salida}} / 2 \text{ en el lado de la sangre} - P_{\text{flujo de entrada}} + P_{\text{flujo de salida}} / 2 \text{ en el lado de filtrado.}$$

Sin embargo, para aplicaciones industriales, pueden requerirse presiones más altas.

Las esterases se pueden inmovilizar por ejemplo sobre una membrana de material compuesto que consiste en un aglutinante polimérico, tal como polisulfona, poli (tetrafluoroetileno y poli(fluoruro de vinilideno) y óxidos metálicos tales como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SrO}_2$ ,  $\text{HfO}_2$  y  $\text{ThO}_2$  (WO 1990/15137). Alternativamente, las esterases puede ligarse covalentemente a

compuestos bi- o poli-funcionales con un grupo fosfato entre el material compuesto y los óxidos metálicos antes mencionados (WO 1999/32549).

5 Los ácidos carboxílicos esterificados no puede solubilizarse directamente por el procedimiento de la invención. En muchos casos, puede indicarse hidrolizar los ácidos carboxílicos con el fin de hacerlos adecuados para la solubilización. Esto se puede lograr con hidrolasas, más específicamente con esterasas, lipasas, respectivamente. Hay una amplia variedad de esta clase de enzimas que se encuentran en los organismos vivos y las plantas. Para el uso en la sangre o el plasma, las esterasas que hidrolizan los residuos de alcilo de la glicerina son de interés. Puede ser de interés hidrolizar solamente los ácidos carboxílicos de mono-, di- o triglicéridos usando hidrolasas triacilglicerol (EC 3.1.1.3) y para prescindir de los fosfolípidos. Sin embargo, en algunas situaciones, podría indicarse la eliminación de todas las clases de ácidos carboxílicos esterificados, que se puede lograr por medio de las esterasas respectivas (CE 3.1). En algunas indicaciones, la hidrólisis de ciertos ácidos grasos es deseable, por ejemplo, ácidos grasos trans, ácidos grasos saturados de cadena larga. En general, la hidrólisis de los ácidos grasos de cadena larga (> 12 átomos C) es una realización preferida del procedimiento de la invención cuando se utiliza para la purificación de la sangre o plasma. Las esterasas debe ser inmovilizadas sobre un material soporte de modo que no puedan salir de la cámara de reacción. Los materiales adecuados para llevar las enzimas inmovilizadas pueden ser laminillas, mallas, membranas, tubos, esferas, ceolitos o geles. La técnica de inmovilización de las enzimas depende del material de soporte utilizado y no es materia de la invención. En una realización preferida para el uso en un extractor para uso médico, se usa óxido de aluminio u óxido de titanio como material de soporte, configurado como bloques que contienen espacios tubulares con una anchura de entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ . Su superficie se funcionaliza con una enzima. Otra realización preferida es el uso de microesferas hechas de PMMA, PEEK, silicio, silicona u otros materiales. El diámetro medio preferido es entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 200 a 400  $\mu\text{m}$ . Su superficie se funcionaliza con una enzima. En una realización preferida, los ácidos carboxílicos y/o triglicéridos son liberados desde vesículas de fosfolípidos que llevan las moléculas dentro de la sangre. Una forma de aplicación preferida para un extractor es el uso de materiales que contienen enzimas como una unidad separada que puede ser almacenada separadamente del extractor. La ventaja de esta técnica modular es que en caso de necesidad de almacenar los materiales que contienen la enzimas a una temperatura definida, el espacio requerido para el almacenamiento se reduce. Además, en caso de pérdida de la actividad enzimática durante el procedimiento de tratamiento, este componente podría ser renovado sin la necesidad de renovar los otros componentes.

#### 30 Procedimientos de diálisis/extracción - Variante II

Además, el compuesto de solubilización puede ser inmovilizado en la membrana de separación o los capilares huecos. Así, el dializador se puede simplificar y comprende las siguientes partes:

- a) medios para conducir la sangre del sujeto a una primera cámara de cavidad;
- b) una primera cámara de cavidad
- c) opcionalmente inmovilizar las lipasas utilizadas para la hidrólisis de los ácidos grasos y la liberación de ácidos grasos adsorbidos o ligados a proteínas, lípidos o membranas celulares;
- d) un panel de separación entre la primera cámara de cavidad y una segunda cámara de cavidad que comprende una membrana de separación o un ensamblaje de capilares huecos caracterizado porque el compuesto de solubilización se inmoviliza en la membrana de separación o en el interior de los capilares huecos;
- e) medios para conducir la solución reactiva desde la primera cámara de cavidad a una segunda cámara de cavidad mediante la aplicación de un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos;
- f) una segunda cámara de cavidad para recibir el filtrado/dializado;
- g) un tanque para reunir el filtrado/dializado purificado de la segunda cámara de cavidad con la fracción de la sangre residual desde la primera cámara de cavidad; y
- h) medios para reconducir las fracciones de sangre reunidas en la circulación del sujeto.

#### 50 Aplicaciones para uso industrial: Separadores de dos cámaras

También se presenta un dispositivo para la eliminación de ácidos grasos de soluciones acuosas que surgen en el procesamiento de crudo de aceite, el procesamiento industrial de alimentos, en el procesamiento de aguas residuales que contienen compuestos bio-orgánicos o en cualquier otra técnica de producción industrial o medioambiental. Para estas aplicaciones, preferentemente se proporciona un sistema de dos cámaras que comprende (Fig. 8).

- a) un primer recipiente (801) para recibir la solución acuosa que contiene el ácido graso que contiene ácidos carboxílicos que vierten continuamente en el recipiente desde una corriente de alimentación (803);
- b) medios para añadir una solución de compuesto solubilizante al primer recipiente (804) y mezclar dicha solución con la solución acuosa que contiene el ácido graso por medio de un sistema adecuado de mezcla (805);
- c) una membrana de separación entre el primer recipiente y un segundo recipiente que comprende una membrana de separación (807) o un ensamblaje de capilares o tubos huecos;
- d) medios conducir la solución reactiva desde el primer recipiente a un segundo recipiente mediante la aplicación de un gradiente neumático, un gradiente eléctrico por medio de un campo eléctrico entre el cátodo (806) y el

ánodo (808) o un gradiente de concentración, un gradiente químico o combinaciones de los mismos;  
e) un segundo recipiente (802);

f) medios para eliminar los asociados de ácidos grasos-compuesto solubilizante de la solución de filtrado por medio de la eliminación del filtrado a través de la convección de una solución de aceptor apropiada que se

ingresa a través de una entrada (809) y que puede fluir a través de una salida (810) y;

g) medios para eliminar la solución purificada del primer recipiente a través de una salida (811).

En otro dispositivo para la eliminación de ácidos grasos de soluciones acuosas que surgen en los procesos industriales anteriormente mencionados, el compuesto solubilizante es inmovilizado a la membrana de separación o al ensamblaje de capilares o tubos huecos. Así, el dispositivo puede ser simplificado y comprende las siguientes partes (Fig. 9):

a) un primer recipiente (905) para recibir la solución acuosa que contiene el ácido graso (901) y una solución acuosa de compuesto solubilizante (902) después de mezclar los dos líquidos por medio de un sistema de mezcla adecuada (903, 904)

b) una membrana de separación entre el primer recipiente y un segundo recipiente que comprende una membrana de separación o un ensamblaje de capilares huecos (906) que tiene opcionalmente el compuesto solubilizante inmovilizado en la membrana de separación o en el interior de los tubos huecos o el lado interior de un módulo enrollado en espiral;

c) medios para conducir la solución de reactivo desde el primer recipiente a un segundo recipiente mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos; y

d) un segundo recipiente (908) que recibe la solución reactiva que puede salir de la cámara a través de una salida (909);

e) una cámara de recogida (907) que se sella al primer y segundo recipiente mediante un plano de sellado (912, 913), siendo atravesada por los tubos huecos o el lado exterior de los módulos enrollados en espiral; y

f) una entrada (911) y una salida (910) de la cámara de recogida que permite la perfusión de solutos a través de la cámara de recogida.

La solubilización de la invención es la solubilización y separación de los ácidos carboxílicos de aceites también es aplicable durante el procesamiento farmacéutico, químico o industrial por medio de la separación fluido-fluido. Los ácidos carboxílicos pueden estar presentes como un aceite, una emulsión (OW, W/O) o como un sistema de fluido/fluido. Por lo tanto, el dispositivo puede comprender, además, las siguientes partes:

h) Medios para mezclar la solución que contiene el ácido carboxílico y el compuesto de solubilización por medio de calentamiento, sonificación, condiciones de flujo laminar o turbulento en dicha primera cámara;

i) Medios para transferir la emulsión mezclada a dicha segunda cámara y separar la emulsión mezclada por medio de gravedad o centrifugación;

j) Una tercera cámara para recibir el aceite purificado desde la segunda salida de la segunda cámara;

k) Una cuarta cámara para la recepción de los asociados de ácido carboxílico y el compuesto solubilizante desde la primera salida de la segunda cámara;

l) Un depósito para un ácido soluble en agua;

m) Medios para suspender dicho ácido soluble en agua desde el depósito en dicha cuarta cámara;

n) Medios para mezclar la solución en dicha cuarta cámara;

o) Una quinta cámara adecuada para la separación de fases por gravedad para recibir la solución mixta de dicha cuarta cámara;

p) Medios para conducir la solución mixta de dicha cuarta cámara a dicha quinta cámara;

q) Una sexta cámara para la recepción de los ácidos carboxílicos purificados desde dicha quinta cámara;

r) Medios para conducir los ácidos carboxílicos purificados desde dicha quinta cámara a dicha sexta cámara;

s) Una séptima cámara para recibir la solución que contiene el compuesto de solubilización y la recolección de ácido soluble en agua en la parte inferior de dicha quinta cámara;

t) Medios para conducir la solución que contiene el compuesto de solubilización y el ácido soluble en agua a una séptima cámara;

u) Medios para conducir la solución desde la séptima cámara a través de un dispositivo de electrodiálisis o un intercambiador de iones para separar el compuesto de solubilización a una cámara de catolitos y el ácido soluble en agua añadido a una cámara de anolitos;

v) Medios para conducir la solución desde la cámara de catolitos a dicho recipiente para el compuesto solubilizante;

w) Medios para conducir la solución desde la cámara de anolitos al depósito para el ácido soluble en agua;

x) Medios para conducir la solución de retinato purificada después de la electrodiálisis a una membrana de filtro hidrófila y;

y) Medios para volver a usar el filtrado acuoso; y

que comprende opcionalmente

z) Medios para suspender y mezclar un solvente orgánico a la solución de la séptima cámara.

El correspondiente método para aplicar tal dializador/extractor integrado modificado comprende los siguientes pasos adicionales, respectivamente modificatorios:

- 5 f) Mezclar la solución que contiene ácido carboxílico y el compuesto de solubilización por medio sonificación, condiciones de flujo laminar o turbulento en dicha primera cámara;
- g) Transferir la emulsión mixta a una segunda cámara;
- 10 h) Separar dicha emulsión mezclada en dicha segunda cámara por medio de gravedad y centrifugación;
- i) Conducir el aceite purificado a través de la segunda salida de la segunda cámara a una tercera cámara;
- j) Suspender un ácido soluble en agua desde un depósito en una cuarta cámara;
- k) Mezclar la solución en la cuarta cámara;
- 15 l) Conducir la solución mixta desde dicha cuarta cámara a una quinta cámara;
- m) Realizar la separación de fases por gravedad en dicha quinta cámara con la solución recibida desde la cuarta cámara;
- n) Conducir los ácidos carboxílicos purificados de dicha quinta cámara a una sexta cámara;
- o) Conducir la solución que contiene el compuesto de solubilización y el ácido soluble en agua que se acumula en la parte inferior de dicha quinta cámara a una séptima cámara;
- 20 p) Suspender y mezclar un solvente orgánico con la solución en la séptima cámara;
- q) Conducir la solución desde la séptima cámara a través de un dispositivo de electrodiálisis para separar el compuesto de solubilización a una cámara de catolitos y el ácido soluble en agua añadido a una cámara de anolitos;
- r) Realizar la electrodiálisis en la solución de la séptima cámara;
- 25 s) Conducir la solución de la cámara de catolitos a dicho recipiente para el compuesto solubilizado;
- t) Conducir la solución desde la cámara de anolitos al depósito para el ácido soluble en agua;
- u) Conducir la solución de retinato purificada después de la electrodiálisis a una membrana de filtro hidrófila; y
- v) Almacenar el filtrado acuoso para su reutilización.

30 Es posible además que el dispositivo para la eliminación de ácidos grasos de soluciones acuosas de acuerdo con los dos dispositivos descritos anteriores comprenda adicionalmente medios para inmovilizar esterasas utilizadas para la liberación de ácidos grasos adsorbidos o ligados a otros compuestos presentes en la solución acuosa o no acuosa.

35 Otra realización del efecto de solubilización es la solubilización y separación de ácidos carboxílicos de soluciones orgánicas que consisten en proteínas, aminoácidos y otras moléculas solubles en agua durante el procesamiento farmacéutico, químico, biológico o industrial por medio de la separación fluido-fluido. Un dispositivo puede ser simplificado y comprende las siguientes partes (Fig. 10):

- 40 a) un primer recipiente (1001) para la recepción de la materia orgánica / solución que contiene el ácido carboxílico (1009);
- b) mediante la suspensión de la solución del compuesto solubilizante desde un recipiente de almacenamiento (1010) para dicha solución y mezcla de la solución del primer recipiente con la solución del compuesto solubilizante utilizando un sistema de mezclado (1011);
- 45 c) medios para conducir la solución mixta a un segundo recipiente (1002)
- d) medios para mezclar la solución procedente del primer recipiente con una solución de  $\text{CaCl}_2$  u otro material complejante procedente de un recipiente de almacenamiento (1003), mientras que se suspende al segundo recipiente por medio de una bomba (1005) que asegura la mezcla completa de las dos soluciones, precipitando así los ácidos carboxílicos solubilizados por el compuesto solubilizante;
- 50 e) medios para el filtrado de la solución orgánica purificada ascendente con el fin de retener las partículas precipitadas (1006);
- d) medios para la eliminación mecánica continua del precipitado (1007);
- e) medios para transferir el precipitado a un tercer recipiente y lavar el precipitado transferido (1004);
- f) medios para acidificar el precipitado en el tercer recipiente;
- 55 g) medios para la separación de fases en el tercer recipiente, por solventes orgánicos;
- h) medios para eliminar la fase superior del tercer recipiente que contiene los ácidos carboxílicos separados;
- i) medios para transferir la solución orgánica purificada desde el segundo recipiente (1002) a otro recipiente (1008); y
- j) medios para separar el compuesto solubilizante por electrodiálisis, diálisis, el uso de resinas de intercambio catiónico o quelación de cationes;

60 Opcionalmente, los pasos siguientes pueden ser intercalados, independientemente uno de otro:

- d1) medios para la adición de uno o más potenciadores de la complejación, el ajuste del pH y/o para la adición de solventes orgánicos seleccionados a partir de metanol, cloroformo y éter dietílico;
- 65 i1) medios para realizar una o más etapas de purificación para eliminar la materia orgánica y/o inorgánica todavía

presente en el medio orgánico acuoso purificado.

## E. Materiales para el uso del procedimiento de la invención

### 5 1. Interfaces de separación de fases y materiales de los mismos

En general, todo tipo de materiales de separación se puede utilizar para la separación de ácidos carboxílicos solubilizados de acuerdo con el procedimiento de la invención. Puesto que hay un amplio campo de aplicaciones, la interfaz de separación de fases tiene que ser adaptada a la condición respectiva. En el caso de un proceso en el que el tamaño de los ácidos carboxílicos solubilizados es más pequeño que el material, respectivamente, los compuestos que deben ser purificados, puede realizarse la filtración clásica por exclusión de tamaño. Cuanto menor sea la diferencia de tamaño entre las moléculas de la solución que se va a purificar y los ácidos carboxílicos, más técnicas de separación micro- y nano-fluídicas tienen que ser empleadas. Para su uso, las propiedades de la superficie de la interfaz determinan la eficacia de la separación. Puesto que los ácidos carboxílicos que se van a separar pueden variar de diferentes. En general, las condiciones micro- o nano-fluídicas exhiben las mejores condiciones para la separación con una interfaz de separación de fases. Por lo tanto, los materiales de interfaz pueden ser materiales compuestos que consisten en un material de soporte, un enlazador/material de relleno, y el material de funcionalización, que se compone en varias combinaciones. Los materiales de soporte pueden ser de origen orgánico o inorgánico. Los ejemplos se enumeran en la sección "Materiales de separación de membrana". Los materiales vinculadores o de relleno pueden ser orgánico o inorgánico y seleccionarse de la lista en la sección "Materiales de separación de membrana". Los compuestos preferidos para ser funcionalizados en la superficie de la interfaz se enumeran en la sección de "Materiales para la funcionalización de la superficie". Superficies, que están en estrecho contacto con la solución a granel que se va a purificar, puede tener diferentes demandas a las propiedades de la superficie que la interfaz de separación de fases. Esto puede ser cierto para las aplicaciones que se utilizan para la purificación de la sangre. A fin de garantizar la hemocompatibilidad, la superficie que está en contacto con la sangre o plasma debe ser cubierta con materiales de compatibilidad conocida. Además, puede ser aconsejable inmovilizar los compuestos solubilizantes en materiales de una zona de reacción o interfaz de separación de fases con el fin de evitar la mezcla de los compuestos de solubilización con la solución que se va a purificar o reducir la cantidad del compuesto solubilizante necesario. Lo mismo es cierto para el uso de hidrolasas cuando es necesaria su utilización en combinación con el procedimiento de la invención.

### 2. Hidrolasas

Las hidrolasas son un grupo importante de enzimas (EC 3). Son capaces de escindir los ésteres, éteres, péptidos, glucósidos, anhídridos de ácido y los enlaces C-C de manera hidrolítica. Un subgrupo importante de hidrolasas son las esterasas (EC 3.1). Las esterasas son enzimas que descomponen un enlace de éster en un alcohol y un ácido orgánico (saponificación). Entre las esterasas, las lipasas (EC 3.1.1) constituyen un subgrupo importante. Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces de éster de sustratos lípidos insolubles en agua, la mayoría de todos los triglicéridos, en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. Por lo tanto, las lipasas son una subclase de las esterasas. Juegan importantes papeles fisiológicos en la digestión de los lípidos de la dieta, haciendo disponible la energía almacenada en estos compuestos.

Las aplicaciones industriales de lipasas involucran lipasas de los hongos y las bacterias que desempeñan un papel importante en prácticas humanas tan antiguas como el yogur y el queso de fermentación. En las aplicaciones más modernas, las lipasas se utilizan en la cocina, en los detergentes para ropa, e incluso como biocatalizadores en la conversión de aceite vegetal en combustible.

La inmovilización de las lipasas ofrece la ventaja de facilitar la recuperación de la enzima para la reutilización. En comparación con la inmovilización por métodos como la adsorción o la inclusión, la inmovilización covalente de enzimas lipófilas tiene la ventaja que la actividad lipolítica no puede ser eliminada por los surfactantes. Se ha demostrado que las lipasas pueden ser covalentemente inmovilizadas en nanotubos de carbono, así que pueden ser utilizadas como catalizadores en fase sólida. Otra aplicación de la inmovilización de la lipasa se ha demostrado en organogeles a base de celulosa. Otros ejemplos de inmovilización covalente de lipasa incluyen aquellos en perlas magnéticas de micro-tamaño, en sepabead y en polifenilsulfona.

De acuerdo con la invención, las hidrolasas se pueden usar para la liberación de ácidos grasos de mono-, di-, o triglicéridos en la sangre, los tejidos del cuerpo, la comida o el procesamiento de combustible y aceites. En una realización preferida, se utilizan esterasas. Más preferidas son las lipasas. Las más preferidos son triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3), fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4), colinesterasa (EC 3.1.1.8) y la lipoproteína lipasa (EC 3.1.1.34).

### 3. Membranas

a) Propiedades de las membranas que se utilizan en diálisis

En principio, para las membranas clasificados como micro-membranas, pueden usarse ultra-nano-filtros. La arquitectura puede ser simétrica o asimétrica, porosa o compacta. Pueden consistir en los materiales enumerados en la sección "Materiales de apoyo o de polímeros" en el capítulo "Materiales de membranas de separación". Las membranas pueden ser planas o tener una configuración de fibra o tubo hueco. La superficie de los poros o canales transversales atraviesan y/o la interfaz con la corriente de alimentación pueden funcionalizarse con las sustancias enumeradas en la sección "Materiales para la funcionalización de superficies".

Las aberturas de transmembrana consisten en canales cilíndricos o aplanados o tubos con pequeña variación en el diámetro del canal o tubo (<20%) que intersecan de manera altamente ordenada la membrana en los ángulos rectos a la superficie. Se prefiere el uso de membranas que consisten en nanotubos perpendiculares o membranas de filtro que tienen capas (dobles) de un lípido ligado o estructuras similares a la membrana plasmática que sellan la superficie de la membrana.

El transporte de masa de los ácidos carboxílicos se puede lograr por un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o combinaciones de los mismos. Los métodos de difusión que utilizan un gradiente de concentración son los más comúnmente usados. La capacidad de difusión se puede aumentar mediante el uso de medios de aceptores que exhiben un coeficiente de partición mayor para la sustancia a purificar que en la solución donante. En principio, los materiales con una alta afinidad para aceptar aniones orgánicos se utilizan en una realización preferida. Una clase preferida son las moléculas que presentan grupos amino (primario, secundario, terciario cuaternario), un grupo fosfato o calcio. Las moléculas, respectivamente sus estructuras deben presentar un tamaño mínimo que es mayor que el rango inferior de las aberturas (canales) de la membrana de diálisis o medio. Si el tamaño molecular es más pequeño, estas moléculas pueden ser irreversiblemente inmovilizadas sobre una matriz en su lugar. En una realización preferida, se usa el soporte de polisterol reticulado en medio de la funcionalidad, es decir, poli (cloruro de acrilamido-N-propil trimetilamonio, poli[(3- (metacriloilamino)-propil] trimetilamonio). Otra realización preferida es el uso de macromoléculas como ciclodextrinas y proteínas, es decir, proteínas de ácidos grasos de ligamiento o de albúmina. Estas proteínas podrían ser libremente solubilizadas o inmovilizadas sobre una matriz. La selección de los materiales de la matriz depende del campo de aplicación. Los materiales puede consistir en sólidos, fibras, mallas, gránulos y ceolitos. El uso de microesferas y ceolitos se prefiere. Los materiales pueden consistir en silicio, metales, materiales cerámicos o polímeros. En realizaciones preferidas, se usa aluminio, titanio, silicón, poliácridatos, polilactatos, policarbonato, celulosa y sus ésteres, acetato de celulosa, polisulfona (PS) , polietersulfon (PES), poliamida (PA), fluoruro de polivinilideno (PVDF), poliacrilonitrilo (PAN), polieterimida (PEI) y/o poliétercetona (PEEK).

### 3.1 Membranas con un compuesto solubilizante inmovilizado

También se proporciona una membrana de separación donde un compuesto de solubilización se inmoviliza en la superficie de la membrana en el lado de afluencia.

Aquí, lado de afluencia significa el lado de la membrana desde el cual la solución se conduce a través de la membrana. En los dializadores, este lado se refiere a la primera cámara de cavidad. En los separadores de dos cámaras, este lado se refiere al primer recipiente.

El compuesto de solubilización puede ser inmovilizado directamente al polímero formador de membrana, o puede ser unido por medio de una molécula de enlace. Dicha molécula de enlace puede ser un oligopéptido de 1 a 10 aminoácidos, o polipéptidos de hasta varios cientos de aminoácidos. Estos péptidos están ligados covalentemente a la arginina y/o otros compuestos solubilizantes. En caso de que el compuesto de solubilización sea arginina o un derivado de la misma, la arginina inmovilizada debe ofrecer libre acceso a su grupo guanidina para garantizar que la interacción de la invención con un ácido graso pueda tener lugar.

En una realización particularmente preferida, la arginina se inmoviliza en el interior de los poros de la membrana. Así se asegura que los ácidos grasos libres deban pasar cerca de una arginina cuando se conducen a través de la membrana. Esta inmovilización mejora la eficacia del proceso de purificación. Por lo tanto, menos arginina tiene que ser utilizada. Alternativamente, los parámetros físicos del proceso de diálisis se puede ajustar en consecuencia. Esto puede ser particularmente ventajoso en diálisis de sangre a fin de conservar los componentes sensibles de la sangre.

También se proporcionan membranas en que el compuesto de solubilización se inmoviliza en la superficie de la membrana en el lado de afluencia, así como en el interior de los poros de la membrana.

También se proporciona un capilar hueco donde el compuesto solubilizante se inmoviliza en el interior del capilar. Dependiendo del polímero a partir del cual se forma el capilar, el compuesto de solubilización puede ser inmovilizado de manera similar como en el interior de un poro de la membrana, según se describió anteriormente. Las ventajas de esta realización ya se han discutido en el párrafo anterior.

Así, un capilar hueco se caracteriza porque el compuesto de solubilización se inmoviliza dentro del capilar.

### 3.2 Membranas con hidrolasas inmovilizadas

En una realización particularmente preferida, las lipasas se inmovilizan adicionalmente en el lado de afluencia

de la membrana de separación. Aquí la arginina y/o otros compuestos solubilizantes pueden también ser inmovilizados en el lado de afluencia de la membrana, o en el interior de los poros de la membrana, o en una combinación de ambos. La ventaja de esta realización es que no se necesitan más medios para que las lipasas se inmovilicen. Además, la estrecha proximidad entre la liberación basada en la lipasa de los ácidos grasos a la arginina inmovilizada (o compuesto solubilizante) aumenta la probabilidad de que un ácido graso libre interactúe con una arginina y/o otros compuestos solubilizantes. Al aumentar la distancia, la probabilidad es mayor que el ácido graso liberado se reabsorba a una estructura hidrófoba antes de interactuar con una arginina o un compuesto solubilizante.

### 3.3 Materiales de membranas de separación

Los siguientes polímeros resultaron adecuados para el uso en membranas de separación: poliolefinas, polietileno (HDPE, LDPE, LLPE), etileno fluorado, copolímeros de etileno con buteno-1, penteno-1, hexeno-1, copolímeros de etileno y propileno, EPR-caucho o EPT-caucho (tercer componente con estructura dieno entre otros), dicitlopentadieno, etilideno, norborneno, metileno-dometileno-hexahidronaftalino, cis-cis-ciclooctadieno-1,5-hexadieno-1,4, hexil-(1-hexeno-metil hexadieno), copolímero de etileno-acetato de vinilo, copolímero de etileno-metacrílico, etileno-N-vinilcarbazol, metacrilamida-N,N'-metileno-bis (met) acrilamida-alilglicidil éter, glicidil (met) acrilato, polimetacrilato, polihidroxiacetato, estireno-glicidilo, copolímeros de metacrilato, polimetil penteno, poli (metacrilato de metilo-ácido metacrilatoilamido glutámico), poli (glicidil metacrilato-co-dimetacrilato), copolímero de estireno-poliivinilpirrolidona-glicidilo metacrilato, mezclas de estireno-poliivinilpirrolidona con crospovidona, etileno-trifluoroetileno, polipropileno, polibuteno-1, poli-4-(metilpenteno-1), polimetilpentano, copolímero de poliisobutileno, copolímero de isobutileno-estireno, caucho de butilo, poliestireno y estireno modificado, estireno clorometilado, estireno sulfonado, poli-(4-aminostireno), copolímero de estireno-acrilonitrilo, copolímero de estireno-acrilonitrilo-butadieno, copolímero de acrilonitrilo-estireno-acrilester, copolímero de estireno-butadieno, copolímero de estireno-divinilbenzol, copolímero de ácido anhídrido estireno-maleico, polidienos en cis-trans, en configuración de 1-2 y 3-4, butadieno, isopreno, caucho natural purificado, copolímero de estireno-butadieno (SBR), polímeros de tres bloques (SBS), copolímero de NBR acrilnitrilo-butadieno, poli-(2,3-dimetilbutadieno), un copolímero de tres bloques de polibutadieno terminado con aminas secundarias cicloalifáticas, o -benzal-L-glutamato o polipéptidos, o N-carbobenzoxi-L-lisina, poli-(alquenamero)-polipentenamero, poli-(1-hexenmetil-hexadieno), poli-fenileno, poli-(p-xilileno), acetato de polivinilo, copolímero de acetato de vinilo-estearato de vinilo, copolímero de acetato de vinilo-cloruro de vinilo, alcohol polivinílico, polivinil formal, butiral de polivinilo, éter polivinílico, poli-(N-vinil-carbazol), poli-N-vinil pirrolidona, poli-(4-vinil piridina), poli-(2-óxido de vinil piridinio), poli-(2-metil-5-vinil-piridina), butadieno-(2-metil-5-vinil-piridina)-copolímero, politetrafluoroetileno, copolímero de tetrafluoroetileno-hexafluoropropileno, copolímero de éter de tetrafluoroetileno-perfluoropropilvinilo, copolímero de tetrafluoroetileno-etileno, copolímero de tetrafluoroetileno-trifluoronitrosometano, copolímero de éter de tetrafluoroetileno-perfluorometilvinilo, copolímero de tetrafluoroetileno-(perfluoro-4-cianobutilvinilo éter), poli-(trifluoroclorometileno), copolímero de trifluorocloroetileno-etileno, fluoruro de polivinilideno, copolímero de fluoruro de hexafluoroisobutileno-vinilideno, fluoruro de polivinilo, cloruro de polivinilo, PVC resistente a los impactos por mezcla de ABS, MBS, NBR, PE clorados, FVAC o poliácrilatos, PVC blando, PVC postclorado, copolímero de acetato de polivinilo cloruro-vinilo, copolímero de vinilo-cloruro propileno, copolímero de polivinilideno cloruro-vinilo cloruro-vinilo cloruro-vinilideno cloruro, copolímero de vinilideno cloruro-acrilonitrilo, ácido poliacrílico, copolímero de ácido acrílico-ácido itacónico, copolímero de ácido acrílico-ácido metacrílico, copolímero de éster-acrilonitrilo de ácido acrílico, copolímero de éter de éster-2-cloroetilenovinilo de ácido acrílico, poli-(1,1-dihidroperfluoro-acrilato de butilo), poli-(3-perfluorometoxi-1,1-dihidroperfluoropropilo acrilato), polisulfona, poliácroleins, poliácridamida, ácido acrílico- copolímero de acrilamida, copolímero de acrilamida-ácido maleico, copolímero de acrilamida-hidroxiacetato, copolímero de acrilamida-metilmacrilato, copolímero de anhidrido de acrilamida-ácido maleico, copolímero de anhidrido de acrilamida-ácido metacrílico, copolímero de acrilamida-anilino-acrilamida, copolímero de acrilamida-(N-acrilol-4-carboximetil-2,2-dimetiltiazolina), polimetacrilamida, ácido metacrílico- copolímero de metacrilnitrilo, ácido metacrílico-3- copolímero de fluoroestireno, copolímero de ácido metacrílico-4-fluoroestireno, copolímero de ácido metacrílico-3-fluoroanilido, copolímeros nitrados de ácido metacrílico con ácido metacrílico-3-fluoroanilido o fluoroestireno o copolímeros de ácido metacrílico con 3,4-isotiocianatostireno, o N-vinil-pirrolidona con anhidrido de ácido maleico, o alcohol polivinílico y alcohol poloalílico, poliácridonitrilo, copolímero de acrilonitrilo-2-vinil piridina, copolímero de acrilonitrilo-metalilsulfonato, copolímero de acrilonitrilo-N-vinil pirrolidona, PAN que contiene grupos hidroxilo, copolímero de acrilonitrilo-acetato de vinilo, copolímero de acrilonitrilo-éster acrílico, compuestos de polialilo, ftalatos de polidialilo, cianurato de politrialilo, poli- $\alpha$ -cianoacrilato, polidimetilaminoetil metacrilato y copolímeros de acrilonitrilo, copolímero de metilmacrilato-laurilmacrilato, copolímero de P-acetaminofeniletoximetacrilato-metilmacrilato, copolímero de glicoldimetilmacrilato-metacrilato, poli-2-hidroxiacetato, copolímero de 2-hidroxiacetato-metilmacrilato, copolímero de glicoldimetacrilato-metacrilato, poli-2-hidroxiacetato, copolímero de 2-hidroxiacetato-metilmacrilato, copolímero de glicolmetacrilato-glicoldimetilmacrilato, copolímeros de HEMA-estireno de bloque y de injerto, poli-N,N-P,P-oxidifenilenelemetimida, polidietilenglicol bisalilcarbonato, poliéteres alifáticos, polioxiacetilenos, polioxiacetilenos, polifluoral, policloral, óxidos de polietileno, politetrahidrofurano, óxido de polipropileno, copolímero de óxido de etileno óxido de propileno, copolímero de óxido de propileno-alilglicidil éter, poliepiclorhidrina, copolímero de óxido de etileno-epiclorhidrina, poli-1,2-diclorometil-óxido de etileno, poli-2,2-bis-clorometil oxaciclobutano, resinas epoxi, bis-fenol-A-diglicidil éter, epoxidados de fenol-formaldehído, cresol-formaldehído, resinas, vinculación transversal con anhídridos de ácidos carboxílicos, aminas tales como dietileneamina, isoforondiaminas, 4,4-diaminodifenil-metano, poliéteres aromáticos, óxidos de polifenileno, polifenol, resinas fenoxi, poliésteres alifáticos, polilactida, poliglicolida, ácido poli- $\beta$ -propiónico, poli- $\beta$ -D-hidroxiacetato,

5 polipivrolactona, poli- $\epsilon$ -caprolactona, polietileno glicol adipato, polietileno glicol sebacato, poliésteres no saturados, de anhídrido de ácido maleico, anhídrido de ácido ftálico, ácido isoftálico, ácido tereftálico o ácido HET con glicol de etileno, 1,2-propileno glicol, neopentil glicol, bisfenoles oxetilados o ciclododecan diole, resinas de poliéster insaturadas o resinas de ésteres vinílicos por copolimerización de poliésteres insaturados con estireno, metacrilato, monómeros de
 10 vinilo, acetato de vinilo, metacrilato de metilo, policarbonato, policarbonato de bisfenol A y sus derivados y poliéteres, poliésteres, policarbonatos de bisfenol A segmentados y sus poliéteres A derivados y alifáticos, así como poliésteres alifáticos (véase más arriba), polietileno glicol tereftalato (PET) de superficie modificada, injertado con ácido acrílico o por hidrólisis parcial de la superficie de PET, polietileno glicol tereftalato, polietileno glicol tereftalato-adipato, polietileno glicol tereftalato, segmentados con bloques de poliéter y bloques de poliéster alifático y bloques de politetrahidrofurano,
 15 poli-p-hidroxibenzoato, copolímero de ácido hidroxibenzoico-hidroquinona, copolímero de ácido hidroxibenzoico-ácido tereftálico, copolímero de ácido hidroxibenzoico-p,p-difenil éter, polivinil pirrolidona, copolímero de polivinil pirrolidona-anhídrido de ácido maleico, resinas alquídicas de glicerol, trimetilolpropano, pentaeritrita, sorbitol con ácido ftálico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido adipínico y ácidos grasos de aceite de linaza, aceite de ricino, aceite de soja, aceite de coco, polisulfuros alifáticos-(R-Sx-) = contenido de azufre, polisulfuros aromáticos, politio-1,4-fenileno, éter aromático polisulfido de fenol y tiofeno, sulfonas de poliéter, polisulfo-1,4-fenileno, poli-p-fenileno sulfona, poliiminas, polietilenimina, polietilenimina ramificada, polialquilenamina, poliamida, polihexametilenadipamida, amida sebácica polihexametileno, polihexametileno dodecano diamida, politridecan brasílico amida, versamidas de aceites vegetales con diaminas y triaminas, poliamida de  $\omega$ -aminocarboxílicos con  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ácidos aminocarboxílicos o lactamas, ácido tereftálico-m-copolímero de aminobenzamida, hidrazida de poliamida, por ejemplo, de ácido isoftálico y m-aminobenzohidrazida, polipiperazina amida, por ejemplo, de ácido fumárico y dimetilpiperazina, polibencimidazoles de ácido tereftálico y tetramino benceno (sustituido), o de diamino fenil éteres y diclorofenil sulfona (sustituido y ciclizado), o de m-fenileno isoftalamida y tereftalamida, poliimididas, por ejemplo, de dianhídrido piromelítico, metoxi-m-fenileno-diamina, pirrones, por ejemplo, de dianhídrido piromelítico y diamino bencidina, poliamidas aromáticas, isoftalamida de poli-m-fenileno, poli-p-benzamida, tereftalamida de poli-p-fenileno, m-amino-ácido benzoico-p-fenileno-diamina-copolímero de ácido isoftálico, poli-4,4'-difenil sulfona tereftalamida de ácido tereftálico y hexametilentetramina, ácido tereftálico y trimetil hexametilendiamina y trimetil 2,4,4-trimetil hexametilendiamina, a partir de ácido tereftálico, y diaminometileno norboneno  $\epsilon$ -caprolactama, de ácido isoftálico y laurilactam, a partir de ácido isoftálico y di-4-(ciclohexil amino-3-metil)-metano, a partir de 1,12-decano diácida y 4,4'-diamino dicitlohexil metano, poliamidas aromáticas con heterociclos, por ejemplo, dicloruro de ácido dicarboxílico, ácido tereftálico y ácido isoftálico, heterociclos diamínicos con estructuras de oxidazol, triazol, bitiazol y bencimidazol, 3-(p-aminofenil)-7-amino-2,4-(1H,3H)-chinazolidion y de ácido isoftálico, poliamino ácidos, poli-metil-L-glutamato, ácido poli-L-glutámico, etc., copolipeptidos, por ejemplo, a partir de ácido glutámico y leucina, ácido glutámico y fenilalanina, ácido glutámico y valina, ácido glutámico y alanina, lisina y leucina, p-nitro-D,L-fenilalanina y leucina etc, poliureas a partir de diisocianatos con diaminas y ureas, poliuretanos a partir diisocianatos alifáticos y aromáticos e hidroxí bifuncionales y trifuncionales que contienen poliésteres (ver arriba) y poliéteres alifáticos (ver arriba) y la modificación opcionalmente con grupo amino bifuncional que contiene, un grupo hidroxilo que contiene y un grupo carboxilo que contiene materiales, por ejemplo, diisocianato de hexametileno, diisocianato de difenil metano, diisocianato de toluileno de 2,4 y 2,6, diisocianato de tolidina, diisocianato de xilileno, glicerina, glicol de etileno, pentaeritrita, 3-dimetilamino-1,2-propanodiol y los hidratos de carbono, ácidos dicarboxílicos alifáticos y aromáticos y sus derivados, o,m,p-fenilendiamina, bencidina, metileno-bis-o-cloroanilina, p,p'-diamino difenilmetano, 1,2-diaminopropano, etilen diamina, amino resinas de urea y urea cíclica, melamina, tiourea, guanidina, uretano, cianamida, amidas de ácidos y formaldehído, así como aldehídos más largos y cetonas, siliconas, polidialquilsiloxanos, siloxano diaril y alquil-aril-siloxanos como dimetil-, dietil-, dipropil-, difenil-, fenilmetil siloxano, siliconas que contienen grupos funcionales, por ejemplo, grupos alilo, fluorosiliconas  $\gamma$ -sustituidas que contienen grupos amino y grupos vinilo, por ejemplo, aminopropil trietoxisiloxano, 2-carboxil propil metil siloxano, polímero de bloque con unidades de dimetilsiloxano y bloques de poliestireno o policarbonato, copolímeros de tres bloques de estireno, acrilato de butilo con  $\alpha,\omega$ -dihidroxi-polimetilsiloxano, 3,3,3-trifluoro metilsiloxano propilo, avocan (90% de silicona y policarbonato), copolímeros de bloques de silicona y policarbonato, polímeros hidrófobos con un aditivo de polímeros hidrófilos, por ejemplo, polisulfona polivinil pirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, por ejemplo, acetilcelulosa, perfluorobutiril etilcelulosa, perfluoroacetilcelulosa, polímeros de poliamida poliaromática, nitrato de celulosa, celulosa carboxi-metilo, celulosa regenerada, celulosa regenerada a partir de derivados de celulosa viscosa y similares, agarosa, polisacáridos como la carragenina, dextrano, manano, fructosano, quitina, quitosano (etilenglicol diglicidil éter, chitoson-EDGE), pectina, glicosamino glicanos, almidón, glucógeno, ácidos algínicos, y todos los deoxipolisacáridos y halógeno-deoxipolisacáridos y sus derivados, amino-deoxipolisacáridos-sulfhidrilo-deoxipolisacáridos y sus derivados, mureine, proteínas, por ejemplo, albúmina, gelatina, colágeno I-XII, queratina, fibrina y fibrinógeno, caseína, plasma-proteínas, proteínas de la leche, crosprovidona, proteínas de estructura de origen animal y tejido de planta, proteínas de soja, proteínas de la industria alimentaria.

Se prefieren los siguientes polímeros para membranas de separación:

60 sílice, siliconas, poliolefinas, politetrafluoroetileno, poliéster uretano, poliéter uretano, poliuretanos, tereftalatos de polietileno, polimetilpentano, polimetilpenteno, polisacáridos, polipéptidos, polietileno, poliéster, poliestireno, polisulfonatos, polipropileno, polietersulfonas, polipirroles, polivinilpirrolidonas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poliortoésteres, poliamidas, poliaromáticos, sefarosa, hidratos de carbono, policarbonato, copolímeros de acrilatos o metacrilatos y poliamidas, éster de ácido acrílico, éster de ácido metacrílico, amida de
 65 ácido acrílico, amida de ácido metacrílico, poliacrilonitrilo, copolímeros de etileno glicol diacrilato o dimetacrilato

de glicol de etileno y acrilato de glicidilo o metacrilato de glicidilo y/o éter alilglicida, celulosa regenerada, acetilcelulosa, polímeros hidrófobos mediante la adición de polímeros hidrófilos, por ejemplo, polisulfona polivinilpirrolidona, derivados y copolímeros de los polímeros mencionados.

5 Poli (cianoacrilato de isohexilo) (PIHCA), poli (cianoacrilato de isobutilo) (PIBCA), poli (cianoacrilato de hexilo) (PHCA), poli (cianoacrilato de butilo) (PBCA), poli (2-dimetilamino) etilmetacrilato (PDMAEMA), polimono-metilamino -metacrilato de etilo (PMMAEMA), poli-N-trimetil-aminoetilmetacrilato (PTMAEMC), poliaminoetil-metacrilato (PAEMC), poliaminoetil-metacrilamida (PAHMAC), poliaminohexil-metacrilato (PAHMC), poliestirol (PS), polivinilpirrolidona (PVP), Polivinilalcohol (PVA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilenimina (PEI).

10 Los materiales inorgánicos incluyen, pero no restringen, a metales tales como aluminio, hierro, magnesio, cobre, oro, iridio circonio, titanio, cinc, estaño, así como sus óxidos, silicio y sus óxidos, así como complejos de silicio como carburo de silicio (SiC), para ser utilizado solo o combinado con sustancias tales como nitruro de silicio, nitruro de aluminio, disiliciuro de molibdeno y carburo de tungsteno, carbono alternativamente y sus óxidos, así como nitruro de boro (BN), carburo de boro (B4C).

### 3.4 Tubos o capilares porosos huecos

20 En general, todos los materiales poliméricos o de cerámica, así como tubos de carbono son adecuados para las membranas separables como son enumerados anteriormente, igualmente son adecuados para capilares huecos. Los materiales y dimensiones pueden variar para las diferentes aplicaciones.

Para uso médico

25 La longitud de las fibras huecas se encuentra entre 30 - 500 mm, preferentemente entre 50 y 300 mm. El diámetro exterior de dicha fibra hueca se convirtió en 0,1 a 1,5 mm, el diámetro interior es de 0,01 a 1 mm y el espesor de la pared del capilar hueco debe ser 5 -200 µm, de preferencia 15 a 50 µm.

Para el uso industrial

30 Las fibras huecas o tubos pueden tener una longitud entre 150 mm a 2000 mm, preferentemente entre 500 mm y 1000 mm. El diámetro exterior de dicha fibra hueca o tubo puede ser de entre 1,5 mm y 10 mm, el diámetro interno entre 1 mm y 4 mm y el espesor de pared del capilar hueco debe ser 200µm a 500µm, se prefiere 300µm a 400µm.

35 Las paredes de los capilares huecos o tubos pueden contener poros. La porosidad de la superficie interior y exterior de los tubos o capilares huecos fabricados de membrana permeable al gas está en el rango de 10 a 90%. El diámetro medio de los poros está en el rango de 0 a 5 µm y de preferencia 0 a 1,5 µm. Virtualmente todos los materiales poliméricos son adecuados para construir capilares huecos o tubos. Especialmente preferido es el poliácilonitrilo. También los materiales compuestos elaborados a partir de organogeles y polímeros son adecuados, igualmente la cerámica, celulosa y combinaciones de estos materiales.

### 4. Materiales para la funcionalización de la superficie

45 Los compuestos que son más apropiadas dependen en gran medida de los ácidos carboxílicos que deben ser separados. Uno o más compuestos pueden ser utilizados. En principio, la red potencial zeta de la interfaz debe tener una carga positiva o neutra y la superficie debe tener propiedades organofílicas / lipófilas e hidrófobas. Los compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos, así como combinaciones de los mismos. Estos incluyen, pero no restringen a hidrocarburos alifáticos o cíclicos, así como compuestos complejos de los mismos, como la colesteroína, ácido cólico y sus derivados, como el ácido quenodesoxicólico y el ácido ursodesoxicólico, lípidos tetraéter y sus conjugados.

50 Más preferidas son las moléculas que tienen una carga catiónica como catión cicloheptatrienilo, o tienen un sustituyente electrófilo como yodo o bromo.

También preferidas son las moléculas que presentan grupos amino (primario, secundario, terciario cuaternario,) como colina, etanolamina, dimetilamina, trietilamina, betaína y análogos.

55 Más preferidas son las moléculas aromáticas de carbono que tienen 2 o más átomos de nitrógeno como diazina como imidazol, inidazol, purina, pirazol, pirimidina, piridazina, triazina y como atrazina, simazina, melamina, más específicamente 2,4,6-trifenilpirilio tetrafluoroborato (2,4,6-GTTF) y 1,3-benzoditiolilio tetrafluoroborato de (1,3-BDYT), bromobenzenediazonio-, -nitronio, benzoditiolilio-, y trifenilpirilio tetrafluoroborato.

60 Otros compuestos preferidos son la arginina y sus derivados como:

5 - (diaminometilideneazaniol)-2-oxopentanoato conocido como oxoarginina, (2S)-2-amino-5-[(N'-metilcarbamididoil) amino] pentanoico, conocido como omega-metil-arginina, 2-amino-5-(diaminometilideneamino)-N-(4-nitrofenil) pentanamida, conocido como arginina-4-nitroanilida, 2-benzamido-5-(diaminometilideneamino) pentanoico, conocido como benzoil-L-arginina; (2S) -2 - [[(2S)-2-amino-5-

(diaminometilideneamino) pentanoil] amino]-5-(diaminometilideneamino) pentanoico, conocido como arinilarginina, 2S) -2 - [[(2S)-2-amino-3-fenilpropanoilo] amino] -5 - (diaminometilideneamino) pentanoico, conocido como fenilalanilarginina; ácido (2S)-2-amino-4-(diaminometilideneamino) butanoico, conocido como L-norarginina; [1-amino-4-(diaminometilideneamino) butil]-hidroxi-oxophosphanio; ácido (2S) -5 - (diaminometilidenoamino) -2 - [(4-hidroxi-4-oxobutanoil) amino] pentanoico, conocido como succinil-L-arginina; ácido (2S)-2-amino-5-[[amino (dimetilamino) metilideno] amino] pentanoico, conocido como N, N-dimetil-L-arginina; ácido (2S) -2 - (3-aminopropanoylamino) -5 - (diaminometilideneamino) pentanoico, conocido como beta-alanil-L-arginina, ácido 2-amino-5-[[amino-(fosfonoamino) metiliden] amino] pentanoico, conocido como fosfoarginina; 2 - [[(2R) -5 - (diaminometilideneazaniol)-1-oxido-1-oxopentan-2-il] azaniumil] pentanodioato, conocida como nopalina; ácido 5 - (diaminometilideneamino) -2 - [(1-hidroxi-1-oxopropan-2-il) amino] pentanoico, conocido como octopina; ácido (2S)-2-amino-5-[ amino-(hidroxiamino) metiliden] amino] pentanoico, conocido como hidroxilarginina; ácido (2S) -2 - (2-carboxietilamino) -5 - (diaminometilideneamino) pentanoico, conocido como L-N2-(2-carboxietil) arginina; [(4S)-4-azaniumil-5-hidroxi-5-oxopentil] - (diaminometilideno) azanio, conocido como arginedio; 4 - (diaminometilideneamino) butanamida, conocido como argentina; y los compuestos que contienen arginina y moléculas relacionadas con la arginina como: arginil-fenilalanina anilida, 2 - (4-aminobutil) guanidina, conocido como agmatina y sus análogos estructurales; 2 - (1-aminobutil) guanidina; 2 - (4-aminobutil) guanidina; 2 - (4-aminobutil)-1-bromoguanidina; 2 - (4-aminobutil)-1-cloroguanidina; 2 - (1-aminopropil) guanidina; 2 - (1-aminopropil) -1 - (diamino-metiliden) guanidina; 2 - (3-aminopropil) -1 - (diaminometilideno) guanidina ; 2 - (3-aminopropil) guanidina; 4-aminobutil (diaminometilideno) azanio; diaminometilideno-[3-(diaminometilideneamino) propil] azanio; 2 - [3 - (diaminometilideneamino) propil] guanidina; 4 - (diaminometilideneamino) butanamida; 2 - (4-aminobutil) -1 - (difluorometil) guanidina; [1 - (diaminometilideno) piperidin-1-ilo-4-il] metilazanio; [4 - (aminometil) piperidin-1-ilo-1-ilideno] metanediamina; 3 - (2-aminoetil) -2,5-dihidropirrol-1-carboximidamida; 3 - (2-aminoetilsulfanil)-1H-1 ,2,4-triazol-5-amina; 2 - [3 - (dimetilamino) propil] guanidina ; 3 - (2-aminoetil) azetidina-1-carboximidamida; 2 - (3-aminopropil) guanidina; 4 - (aminometil) ciclohexano-1-carboximidamida; 2 - [2,2-bis (sulfanil) etil] guanidina; 5 - (aminometil) tiofeno-3-carboximidamida; diaminometilideno-[4 - (diaminometilideneazaniol) butil] azanio; [amino-(diaminometilideneamino) metiliden]-butilazanio, [amino (butilazaniolideno) metil] - (diamino-metiliden) azanio; butilo ( diaminometilideno) azanio;

Además fenilalanina y sus derivados como:

4-guanidinofenilalanina, N-guanil-dl-fenilalanina; ácido (2S)-2- [[(2S)-2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino]-3-fenilpropanoico, conocido como arginilfenilalanina; ácido (2S)-2-amino-3-[4-[(diaminometilideneamino)metil]fenil] propanoico, 2-amino-3-fenilpropanehidrazida; (2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-fenilpropanoil]amino]-5-(diaminometilideneamino)-N-naftaleno-2-il]pentanamida y polifemusina I ó II.

Además guanidina y sus derivados como Urea; 2-metilguanidina; 2 - [4 - 4 [- (diaminometilideneamino) fenil] fenil] guanidina; 3 - (diaminometilideneamino) -5 - [(diaminometilideneamino) metil] benzoico; (2S)-2-amino-3- [4 - (diaminometilideneamino) fenil] propanoico; 2 - [2 - (azocan-1-il) etil] guanidina conocido como sanotensina, N-(diaminometiliden) -2 - (2,6-diclorofenil) acetamida conocido como guanfacina; 2 - [(3-yodofenil) metil] guanidina; 2 metilguanidina-, 2-butil-1-guanidina (diaminometilidene); 2 - [(E) - [(1E) -1 - (diaminometilidenehidrazinilideno) propan-2-iliden] amino] guanidina; 2 - [3 - (1H-imidazol-5-il) propil] -1 - [2 - [(5-metil-1H-imidazol-4-il) metilsulfanil] etil] guanidina; 2 - [(3-iodanilfenil) metil] guanidina; 2 - [yodo (fenil) metil] guanidina; 2 benzilguanidina-; [(E)-N'-(N'-benzilcarbamididoil) carbamididoil] azanio; bencilo (diaminometilideno) azanio; 2 - [[4 - [(diaminometilideneamino) metil] fenil] metil] guanidina; 4-fenil-1 ,4-dihidro-1 ,3,5-triazina-2 ,6-diamina; 2 - [[4 - [amino-(diaminometilideneamino) metiliden] amino] metil] fenil] metil] -1 - (diaminometilidene) guanidina; 2 - (2H-tetrazol-5-il) guanidina; 4 - [5 - (4-carbamimidoidifenoxi) pentoxi] bencenocarboximidamida; 2 - [carbamimidoidil (metil) amino] acético conocido como creatinina; 4 - [2 - (4-carbamimidoidifenil) iminohidrazinil] bencenocarboximidamida; 1-ciano-2-metil-3-[2 - [(5-metil-1H- imidazol-4-il) metilsulfanil] etil] guanidina; 2 - [(Z) - [(1Z) -1 - (diaminometilidenehidrazinilideno) propan-2-ilideno] amino] guanidina; metilglicoxal bis (guanilhidrazona) (conocido como mitoguanazona);

y biguanidinas como 3 - (diaminometilideno) -1,1-dimetilguanidina conocido como metformina; -2 (1E) - [6 - [[amino-[(E) - [amino-(4-cloroanilino) metiliden] amino] metiliden] amino] hexil ] -1 - [amino-(4-cloroanilino) metiliden] guanidina, conocida como clorhexidina; dimetiloctadecil [3 - (trimetoxisilil) propil] amonio; octadecil-cloruro de guanidinio; 1,10-bis (4-clorofenil) -1,3, 5,10,12,14-hexazadispiro [5.2.5 ^ 9,2 ^ (6)] hexadeca-2 ,4,11,13-tetraeno-2 ,4,11,13-tetramina; 3,5-dimetil-4- fenildiazetilpirazol-1-carboximidamida, N, N'-diodadecil-cloruro de guanidinio; 2,2,8,8-tetraalquil-3 ,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-pirrimido-[1,2 - a]-pirimidina; 3 - (diaminometilideneamino) propanoico; 2 - [5 - (diaminometilideno-amino) pentil] guanidina; 2 - [4 - (3-aminopropilamino) butil] guanidina; 2 - (diamino-metilidenoamino) acético ; 3 - (diaminometilideneamino) benzoico. Además amininas tales como

Butanimidamida; decanimidamida clorhidrato; 4 - [4 - (4-carbamimidoidifenil) fenil] bencenocarboximidamida, N, N-dimetil-N'-(4-fenilmetoxifenil) metanimidamida.

Además aminoácidos, más preferentemente fenilalanina, isoleucina, leucina, valina, arginina, lisina, histidina, triptófano, tirosina, prolina.

Además péptidos que consisten en uno o más de estos aminoácidos. El más preferido es el "RDG"-péptido de secuencia (Arg-Asp-Glyc);

y proteínas y macromoléculas con conocidas propiedades lipófilas como la albúmina, las proteínas que ligan ácidos

grasos, o que tienen propiedades de ligamiento a ácidos grasos como las apolipoproteínas, lactoglobulinas, caseína. Además ciclodextrinas o porfirinas y similares, y sustancias como cloro y corpin.

Aminas y poliaminas tales como

colina (2-hidroxietil (trimetil) azanio); fosfocolina, betaína (2 - (trimetilazanioil) acetato de etilo); neostigmina; 2 - [2,3-bis [2 - (trietilazanioil) etoxi] fenoxi] etil-trietilazanioil triyoduro; [(2R) -2,4-dihidroxi-4-oxobutil]-dimetil-(trideuteriometil) azanio conocido como carnitina; 3-hidroxi-4-(trimetil-azanioil) butanoato de etilo, 4-azanioilbutil (3-azanioilpropil) azanio, conocida como espermidina; 3-azanioilpropil-[4 - (3-azanioilpropilazanioil) butil] azanio, conocido como gerontina.

Además conjugados de péptido-carboxilato tales como

(2S) -2,5-bis (3-aminopropilamino)-N-[2 - (dioctadecilamino) acetil] pentanamida, conocido como transfectam; 6-amino-2-[[[(2S) -2,5-bis (3 -aminopropilamino) pentanoil] amino]-N, N-dioctadecilhexanamida;

y péptidos tales como

(2S) -2 - [[2 - [[(2S)-2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] acetil] amino] butanodioico, conocido como péptido RGD; (2S) -2 - [[(2S)-2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] butanodioico, asparagina arinina--dipéptidos, y

polipéptidos tales como 2 - [[2 - [[2 - [[2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino]-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] -5 - (diaminometilideneamino) pentanoil] amino] butanodioico; 2 - [[2 - (2,6-diaminohexanoilamino) -5 - (diaminometilideneamino) pentanoil] amino] butanodioico; 4 - amino-2-[[2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino]-4-oxobutanoico; 2 - [[6-amino-2-[[2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] hexanoil] amino] butanodioico, conocido como timotrinano; 2 - [2 - [[2 - [[2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] -5 - (diaminometilideneamino) pentanoil] amino] propanoíl amino] butanodioico; 3 - [[2-amino-5-(diaminometilideneamino) pentanoil] amino] -4 - [(1-hidroxi-1-oxopropan-2-il) amino]-4-oxobutanoico; (2R) -2 - [[(2S)-2-azanioil-5-(diaminometilideneazanioil) pentanoil] amino] butanodioato .

Además proteínas como: albúmina, protamina, péptidos natriuréticos, gelatina.

## 5. Aceptor-/adsorbente-moléculas/materiales

El proceso de adsorción se define como la adhesión de moléculas a una superficie. Basado en la naturaleza de ligamiento entre la molécula y los fenómenos de adsorción de la superficie se pueden dividir en dos categorías: fisisorción y quimisorción. En fisisorción, no se forman enlaces químicos y la atracción entre el adsorbente y el adsorbato se basa únicamente en fuerzas electrostáticas intermoleculares, tales como las fuerzas de Van der Waals. En quimisorción, se adhiere el adsorbato al sólido en formación de enlaces químicos con la superficie.

Si los asociados de ácido carboxílico y el compuesto solubilizante se adsorben en una segunda cámara de cavidad o un segundo recipiente, un adsorbente debe ser proporcionado, que sea adecuado para la adsorción de estos asociados.

Los compuestos y/o materiales pueden ser de origen natural o sintético. Ejemplos para grupos de materiales adsorbentes que se pueden utilizar en esta invención incluyen, pero no se limitan a las zeolitas, arcillas, carbón activado, alúmina activada, polímeros naturales y sintéticos, alcanos, proteínas y geles de sílice. Los materiales absorbentes se pueden utilizar en diferentes formas, tales como perlas, membranas, fibras o recubrimientos. La combinación de diferentes materiales absorbentes también es posible.

Las zeolitas son minerales de aluminosilicato microporosos con una estructura porosa que pueden acomodar amplia variedad de cationes. Las propiedades selectivas de forma de las zeolitas también son la base para su uso en la adsorción de moléculas. Tienen la capacidad de adsorber preferentemente ciertas moléculas, y excluir otras. Ejemplos de zeolitas incluyen, pero no se limitan a, amicita, analcima, barrerita, belbergita, bikitaita, boggsita, brewsterita, chabazita, clinoptilolita, cowlesita, dachiardita, edingtonita, epistilbita, erionita, faujasita, ferrierita, garronita, gismondina, gmelinita, gobbinsita, gonnardita, goosecreekita, harmotoma, herschelita, heulandita, laumontita, maricopaite, mazzita, merlinoita, mesolita, montesommaita, mordenita, natrolita, ofretita, paranatrolita, paulingita, pentasil, perllialita, filipsita, polucita, escolecita, sodalita, sodio dachiardita, estelerita, estiobita, tetranatrolita, thomsonita, tschernichita, wairakita, pozo, willhendersonita y yugawaralita.

Las arcillas son una sustancia mineral que se compone de pequeños cristales de sílice y alúmina. Los minerales de arcilla se dividen en cuatro grupos principales: el grupo caolinita, el grupo montmorillonita / esmectita, el grupo illita y el grupo clorita. Ejemplos de arcillas incluyen, pero no se limitan a, caolinita, dickita, nacrita, pirofilita, talco, vermiculita, sauconita, saponita, nontronita, montmorillonita, illita, amesita, baileycloro, bentonita, chamosita, kaemererita, cookeita, corundofilita, dafnita, delesita, gonierita, nimita, odinita, ortochoamosita, peninita, panantita, ripidolita, sudoita y turingita.

El carbono activado, también llamado carbón activado, es una forma de carbono que ha sido procesado para

que sea extremadamente poroso y por lo tanto tener una gran área de superficie disponible para las reacciones de adsorción o químicas. Sobre la base de sus características físicas se pueden distinguir en polvo, granulares, extruidos, impregnados y revestidos de polímero.

5 Gel de sílice, un óxido del elemento silicio, es un material amorfo, altamente poroso, forma parcialmente hidratada de sílice. La sílice se produce naturalmente, pero también puede ser preparada sintéticamente. La sílice cristalina es el anhídrido de ácido silícico y por lo tanto el gel de sílice es una forma polimérica de ácido silícico. También sílice pirogénica como Aerosil® o filosilicatos tales como talco, hectorita y montmorillonita puede ser utilizados, así como los recubrimientos poliméricos de los mismos.

10 También son útiles los polímeros sintéticos que se componen de un gran número de microsferas altamente reticuladas. Esta estructura macrorreticular le da una gran área superficial y tamaño de poro uniforme. Ejemplos de polímeros sintéticos incluyen, pero no se limitan a, poliacrilato, poliamida, poliéster, policarbonato, poliimida, poliestireno, acrilonitrilo butadieno estireno, poliacrilonitrilo, polibutadieno, poli (tereftalato de butileno), poli (éter sulfona), poli (éter-éter-cetona) , polietileno, poli (etileno glicol), poli (tereftalato de etileno), polipropileno, poli (metacrilato de metilo), polieteretercetona, politetrafluoroetileno, resina de estireno-acrilonitrilo, poli (tereftalato de trimetileno), poliuretano, polivinil butiral, cloruro de polivinilo, polivinilidenedifluoruro, poli (vinil pirrolidona). Preferidos son el poli (metacrilato de metilo) y la polieteretercetona.

20 La capacidad de ligamiento se puede aumentar mediante la funcionalización de la superficie de los materiales anteriormente mencionados. Esto se puede lograr por moléculas que exhiben propiedades organofílicas. Esta propiedad es compartida con las moléculas mencionadas en la sección Materiales para funcionalización de la superficie. Pueden ser utilizados en las realizaciones preferidas.

25 Una clase preferida son las moléculas que presentan grupos amino (primario, secundario, terciario cuaternario), calcio o magnesio.

## 6. Organogeles

30 La definición más común de un gel es la de un sólido macroscópico, un fluido que no tiene flujo de estado estable. En otras palabras, un gel es un material sólido gelatinoso que puede tener propiedades que van desde suaves y débiles a fuertes y resistentes. Una red estructural tridimensional de enlaces cruzados presta una estructura al gel.

35 Los organogeles son materiales no cristalinos, no vítreos, termorreversibles y sólidos compuestos de una fase líquida orgánica que se gelificó en una red tridimensional reticulada. Las propiedades de un organogel como la elasticidad y firmeza se determinan por su solubilidad y dimensiones de las partículas. La fase orgánica líquida se gelifica mediante agentes gelificantes de bajo peso molecular, los llamados gelificantes. Los organogeles a menudo se basan en el auto-ensamblaje de las moléculas orgánicas. Basados en su caracterización, los organogeles se puede dividir en organogeles de matriz sólida y de matriz líquida. Los geles sólidos son sistemas fuertes, que forman una red rígida permanente a una temperatura específica, mientras que los geles líquidos están formados por redes transitorias. Ya sea que los geles son de tipo sólido, que se caracterizan por redes rígidas permanentes, tales como el caucho vulcanizado, o líquidos, que se caracterizan por redes transitorias, tales como el caucho natural no vulcanizado, también se pueden utilizar para clasificar los geles.

45 Casi todos los solventes orgánicos pueden ser exitosamente gelificados, según se comprende en la definición de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, tales como heptanos, octano, nonano, decano, benceno, tolueno, etil benceno, gasolina, queroseno, aceite lubricante y fracciones de aceite similares, e hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno, cloroformo, carbono, tetracloruro de carbono, metilcloroformo, percloroetileno, dicloruro de propileno, bromuro de metileno, dibromuro de etileno, bromuro de butilo, cloruro de alilo, y bromuro de propargilo o cloruro. Otros tipos de líquidos orgánicos se han gelificado, tal como el aceite mineral y vegetal, lecitina, polisiloxanos, las parafinas, los materiales de cristal líquido nemáticos y esmécticos, electrolitos, líquidos polimerizables y otros.

50 Los líquidos orgánicos se gelifican mediante organogelificantes de bajo peso molecular o gelificantes poliméricos. Los organogelificantes crean una red tridimensional enredando las nanofibras o nanocintas que forma por auto-organización a través de interacciones no covalentes, tales como ligamiento de hidrógeno, van der Waals, apilamiento  $\pi$ , y coordinación.

60 Debido a la naturaleza de la interacción intermolecular, la formación de gel es un proceso termo-reversible. Un determinado gelificante puede gelificar determinados solventes. Un requisito para el proceso de gelificación es una mala solubilidad del gelificante, porque un compuesto con baja solubilidad y poco inclinado a cristalizar muy probablemente forme un gel. El solvente es luego atrapado en los poros de la red y los microcristales del gelificante por las fuerzas capilares.

65 Las moléculas que pueden actuar como LMWG (gelificante de bajo peso molecular) comprenden derivados de ácidos grasos, derivados de esteroides, derivados de antrilo, gelificantes que contienen anillos aromáticos esteroideos y condensados, organogelificantes tipo amino-ácidos, varios tipos de gelificantes y sistemas de dos componentes.

Como se utilizan LMWG por ejemplo hidrocarburos, haloalcanos, alcoholes, acetona, alcanos, cicloalcanos, hexadecanes, ciclohexanos, tolueno, p-xileno, ciclohexanona, dicloroetano, DMSO, etanol, propanol, aceite mineral, queroseno, clorobenceno, aceite de colza, acetato de etilo, dialquiltalatos, DMF, DMA, dioxina, aceite de silicio, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CCl<sub>4</sub>, hidrocarburos aromáticos, piridina, acetonitrilo, cetonas, éter dietílico, alcanos halogenados, hidrocarburos alifáticos, alcoholes alifáticos, aminas alifáticas, metanol, aceites, tetralina, dedecano, hidrocarburos alifáticos de cadena larga, cicloalcanos, laureatos de alquilo, triaquilaminas, metacrilatos y jabones metálicos adicionales, ácidos grasos, perfluoroalquilalcanos, esteroides, ceras, derivados de urea, compuestos de urea cíclicos bis, tereftalamatos, colamidas, carbohidratos, agentes tensioactivos Gemini, amidas de aminoácidos bolaform, canforilo tiosemicarbazida, ciclopéptidos, amidas de aminoácidos, proteínas tales como albúmina o proteína de ligamiento de ácido graso, antrano, derivados de antrilo, fenacinas, tiofenos trimesamidas, heliceninas, lecitinas, hidroxipropilmetil celulosa, nitrocelulosa o gelatina, gelificantes macrocíclicos, ciclohexilamidas, ciclohexanoles, derivados del colesterol, bola anfífilos, uratos alcalinos, ácidos guanílicos, nucleósidos, azul de bromofenol, deoxicolatos rojo Congo, cholatos y otros.

Los organogeles se preparan entregando el gelificante al solvente que ha de ser gelificado. Esto puede suceder mediante la adición del gelificante al solvente, mezclando la solución y calentando si es necesario hasta que se produce la solución. Al enfriarse, la gelificación se produce (gelificación caliente). El gelificante también puede ser añadido a una pequeña cantidad de solvente y calentarse hasta que se disuelva, luego se añade al solvente, se mezclan y fijan (gelificación en frío).

Los organogeles se usan y tienen potencial para su uso en una serie de aplicaciones, tales como farmacia, administración de fármacos, cosméticos, conservación de obras de arte e investigación.

La capacidad de los organogeles para construir estructuras autoorganizadas ofrece un gran potencial en la nanotecnología. Los científicos han creado materiales orgánicos de gel que tienen vacíos a nanoescala interconectados en toda la formación de la masa. Permiten la transferencia de masa que está rígida por fuerzas capilares.

Los organogeles también se puede utilizar como una matriz de inmovilización de enzimas. La lipasa se han descrito como encapsulada en la lecitina y los organogeles basados en microemulsiones formulados con hidroxipropilmetil celulosa o gelatina. La lipasa atrapada conserva su capacidad de catalizar reacciones de esterificación.

Se prefiere el uso de organogeles que muestren nanovacíos con propiedades lipófilas. Una forma adicionalmente preferida de un organogel es la preparación de un xerogel.

## 35 7. Soluciones de aceptor

Las soluciones de aceptor pueden ser acuosas, orgánicas, o emulsiones. Las soluciones acuosas deben contener moléculas aceptoras solubles o inmovilizados como se indica en 4. Materiales para la funcionalización de la superficie, o material aceptor como se indica en 5. Aceptor-/Adsorbente-Moléculas/Materiales.

Las soluciones orgánicas pueden comprender alcanos, alquenos, alquinos, ácidos carboxílicos, ésteres, aldehídos, cetonas, hidrocarburos aromáticos, mono-, di- o triacilgliceroles, aceites de silicona, solventes orgánicos como n-hexano, ésteres, tetrahydrofurano, cetonas, lactonas, acetona, acetonitrilo, nitrometano, nitroarano, dimetilformamida, alcohol, metilsilanos, octametilciclotetrasiloxano, amidas tales como formamida, trietilamina.

## 45 8. Aditivos para preparaciones de compuestos solubilizantes

Un número de los compuestos solubilizantes tales como la arginina se protonizan en agua, lo que resulta de su característica como una base. El pH resultante depende de la concentración respectiva. Por lo tanto, este compuesto solubilizante puede inducir la desnaturalización de la proteína o citolisis cuando se utiliza en una concentración alta. Dado que estos compuestos solubilizantes en su mayoría son moléculas anfífilas, tienden a agruparse por interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilo cargado negativamente y el grupo  $\alpha$ -amino cargado positivamente a valores de pH >8, formando de esta manera polímeros. Por lo tanto, puede ser aconsejable protonizar la solución con el compuesto solubilizante en cierta medida con el fin de ajustar el pH de la solución. Los agentes de protonación preferidos son ácidos carboxílicos de cadena corta, ácido clorhídrico (HCl), ácido bromhídrico (HBr), ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido pentanoico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido málico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido camfersulfónico, ácido china, ácido mandélico, ácido o-metilmandélico, ácido hidrógeno-bencenosulfónico, ácido pícrico, ácido adípico, ácido D-o-toliltartárico, ácido tartrónico, ácido  $\square$ -toluico, ácido (o, m, p) toluico, ácido naftilamina sulfónico, y otros ácidos minerales y en particular ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico, ácido benzoico, ácido ascorbínico, ácido fólico, o aminoácidos tales como ácido aspártico o ácido glutámico.

Un pH preferido para la solubilización de los ácidos grasos en los medios de comunicación es entre 7,4 y 10.

### 9. Micro- o nano-emulsión

La presente invención también se refiere a microemulsiones y nanoemulsiones en un solvente hidrófilo y en particular agua de un ácido carboxílico incluyendo diácidos carboxílicos, triácidos así como tetraácidos y ácidos grasos, especialmente diácidos grasos, triácidos grasos así como tetraácidos grasos y por lo menos un compuesto solubilizante, en donde dicho compuesto solubilizante contiene al menos un grupo amidino y/o al menos un grupo guanidino y en donde el compuesto tiene un coeficiente de partición entre n-octanol y agua de  $K_{OW} < 6,30$ . Así, la microemulsión de la invención y la nanoemulsión de la invención contienen al menos un ácido carboxílico y ácido graso y especialmente al menos un compuesto solubilizante como se describe aquí.

Los compuestos solubilizantes se ha descrito anteriormente en detalle y estos compuestos solubilizantes forman una microemulsión o nanoemulsión con el ácido carboxílico. Los compuestos solubilizantes tienen el mismo número preferido de átomo de carbono como se ha descrito anteriormente, la misma estructura preferida como se ha descrito anteriormente, son preferentemente derivados de arginina, como se describe en la presente memoria, tienen el mismo rango de pH preferido para la reacción de solubilización, la misma relación molar preferida de ácido carboxílico a compuesto de solubilización y las mismas condiciones de reacción preferidas, como se describe anteriormente para los compuestos de solubilización en general.

#### Principales características de las micro- y nano-emulsiones como se define en la sección B.

Es esencial el autoensamblaje molecular espontáneo de la sustancia solubilizante y el ácido carboxílico que se construye por fuerzas electrostáticas como se mencionó anteriormente. Están compuestos por dímeros que tienen una baja tendencia a agregarse a las micelas. En las nanoemulsiones, todos los ácidos carboxílicos puede estar ligados a una sustancia solubilizante creando una emulsión monofásica sin micelas. La mayoría de las estructuras vesiculares mensurable por dispersión de luz dinámica (DLS) era  $< 150$  nm para una emulsión con una proporción molecular de 1:1, véase también el ejemplo 12. Con una mayor proporción del compuesto de solubilización, las vesículas medibles se hicieron más pequeño. A una proporción de 10:01, 98% de las vesículas tenían  $< 2$  nm de diámetro y ningún conjunto mayor que 25 nm. Este auto-ensamblaje de nanopartículas es una característica central de una nanoemulsión. La nanoemulsión es completamente transparente y estable durante más de 6 meses a temperaturas entre  $-20$  y  $100^\circ$  C. La disminución del pH por adición de ácido (HCl) reduce la capacidad de solvatación, lo que podría superarse mediante la adición de arginina. Sin embargo, el pH de la solución es crítico para la capacidad de nano-emulsificación de la arginina, que disminuye por debajo de pH 8. Otra característica central del uso inventivo de micro- o nano-emulsiones es el efecto solubilizante / liberador debido a la reducción de la tensión superficial. Esto permite la penetración y la inundación de los vacíos y capilares a nanoescala. La naturaleza anfifílica de los conjuntos 01:01 permite la adherencia o adsorción a sustancias lipófilas o hidrófilas, respectivamente sólidos, cambiando de ese modo las fuerzas interfaciales de las sustancias antes mencionadas, respectivamente sólidos y/o permitiendo la partición de las moléculas de dichas micro- o nanoemulsiones de la invención y/o de las moléculas disueltas en dichas micro- o nanoemulsiones de la invención dentro o en las sustancias antes mencionadas, respectivamente sólidos y permitiendo la solvatación, licuefacción, desprendimiento o convección de las sustancias antes mencionadas, respectivamente sólidos como se muestra en los ejemplos 5, 9 y 10.

Una ventaja decisiva de la arginina o un compuesto solubilizante según la fórmula I o II es que un co-solvente no es necesario para la construcción de micro- o nanoemulsiones. Sin embargo, la adición de un cosolvente puede potenciar el efecto solubilizante descrito.

Las microemulsiones y nanoemulsiones tienen preferentemente un valor de pH  $> 7,0$  y más preferentemente dentro de un rango de pH de 7,0 a 9,0. Sin embargo, dependiendo del medio desde el cual los ácidos carboxílicos deben ser separados, se pueden obtener valores de pH de las microemulsiones y nanoemulsiones hasta pH 14, mientras que un rango de pH entre 7,0 y 8,0 se usa preferentemente si los ácidos carboxílicos se eliminan de la sangre. No obstante, si no obtiene una solubilización completa, lo que se puede observar si la microemulsión o nanoemulsión no es clara y/o incolora, más compuesto solubilizante puede ser añadido o el valor de pH podría ser aumentado o ambas posibilidades podrían ser utilizadas hasta obtener una microemulsión o nanoemulsión clara y en la mayoría de los casos incolora.

Además, la micro- o nano-separación de los ácidos carboxílicos se puede utilizar para habilitar, respectivamente para aumentar o disminuir, respectivamente, para terminar las reacciones químicas de los mismos, como es conocido en la técnica. Se han usado líquidos no iónicos o surfactantes anfifílicos para disolver los ácidos carboxílicos para este propósito. Sin embargo, el uso de arginina o un compuesto solubilizante según la fórmula I o II para tales cambios en la reactividad química no se ha informado hasta el momento. Se encontró que la nano-separación mejoraba las reacciones químicas tanto de los grupos alquilo como carboxilo, tal como se muestra en el ejemplo 11. Debido a la baja fuerza iónica y una alta estabilidad, las emulsiones son ventajas decisivas en comparación con los emulsionantes iónicos o no iónicos. Además, pueden ser utilizadas como emulsionante específico al reactante o producto que se puede eliminar fácilmente desde el ácido carboxílico solubilizado así como desde una solución de reacción orgánica (Ejemplo 9).

#### Figuras

Fig.1 es un diagrama de flujo del proceso de solubilización de la invención y técnicas de separación.

Fig.2 es un dializador / extractor integrado para la purificación de la sangre de ácidos grasos volátiles.

Fig.3 muestra un módulo de intercambio de ácido carboxílico.

Fig.4 es un dializador / extractor integrado para solubilizar las impurezas de los ácidos carboxílicos para ser utilizado en el procesamiento de aceite industrial.

Fig.5 se refiere a una filtración o difusión electroforéticamente o electrostáticamente impulsada por separación para ser utilizada con la solubilización de la invención.

5 Fig.6 muestra otra realización de un dializador / extractor integrado para la purificación de la sangre de ácidos grasos volátiles.

Fig.7 representa un dializador / extractor integrado típico.

10 Fig.8 se refiere a una realización de un dializador / extractor integrado para ser utilizado para el procesamiento de crudo de aceite, procesamiento industrial de alimentos, en el procesamiento de aguas residuales que contienen compuestos bioorgánicos o en cualquier otra técnica de producción industrial o medioambiental.

Fig.9 muestra la realización de un dializador / extractor integrado simplificado para aplicaciones industriales.

15 Fig.10 se refiere a otra realización de un extractor / dializador integrado simplificado para ser utilizado en la solubilización y separación de ácidos carboxílicos de soluciones orgánicas que consisten en proteínas, aminoácidos y otras moléculas solubles en agua durante el procesamiento farmacéutico, químico, biológico o industrial por medio de la separación fluido-fluido.

## EJEMPLOS

### 20 Ejemplo 1

#### Investigación de la viabilidad para dializar ácidos grasos del plasma.

25 Los ácidos grasos no esterificados, aunque son moléculas pequeñas, no son dializables cuando se suspenden en un medio acuoso debido a que forman micelas por su baja CMC y, por lo tanto, son demasiado grandes para pasar microporos convencionales. La solubilización de la invención eleva la CMC y permite la formación de una nanoemulsión que muestra una partición alta de los ácidos grasos. Por lo tanto, los ácidos grasos solubilizados están presentes como aniones.

30 El uso de la solubilización de la invención para el refinamiento de plasma a partir de ácidos grasos volátiles se investigó en un sistema de modelo de diálisis. Este sistema consistía en una celda del dializador conectada a tubos, dos depósitos y dos bombas de rodillos. La celda de diálisis consistía en dos hemisferios aplanados de vidrio que tenían márgenes aplanados. Los márgenes de ambos hemisferios estaban presionados contra un soporte de la membrana de teflón por un casquillo sellando así las cavidades. El soporte de la membrana de diálisis se componía de dos juntas tóricas de teflón que tenían un diseño de lengüeta y ranura para levantar una membrana con un diámetro de 47 mm y sellar la membrana mediante la compresión de las dos juntas tóricas. Cada uno de los hemisferios de vidrio tenía una perforación en los polos opuestos donde se montó un embudo de vidrio conectado con el vidrio de los hemisferios en su punta y con su base dirigida hacia la membrana. El embudo se hace funcionar como una entrada. Una perforación adicional de los hemisferios se conectó con un tubo de vidrio que operaba como una salida. La entrada y la salida estaban conectados con tubos PTFE. El tubo conectado con el flujo de entrada se intersecó con un tubo de silicona parte de la bomba de rodillos. Los extremos de los tubos de flujo de entrada y salida se unían en un depósito PTFE que tenía un volumen de llenado de 200 ml. El tubo de entrada se conectaba con un adaptador en Y que tenía una junta tipo compresión a través de la cual se hizo avanzar un alambre sensor de presión hacia la cámara de diálisis y se selló al exterior. Las investigaciones se realizaron por duplicado usando una de los siguientes membranas: pista de grabado de policarbonato, 0,4µm (Satorius, Alemania); poliarietersulfona con un corte Dalton de 10.000 (Gambro, Alemania); PVDF con 40 kD (Rhône-Poulenc, Francia); PTFE, 0,05µm (Sartorio, Alemania); óxido de aluminio (Anodisc), 0,02µm (Whatman, EE.UU.).

45 El plasma sanguíneo de origen humano se utilizó para los experimentos. El ácido oleico (grado técnico, Sigma, Alemania) se añadió para lograr una solución de 100 mmol. La solución preparada se dejó disolver durante la agitación a 37° C durante 10 minutos. A continuación, se agregó 100 ml de agua desionizada o solución de arginina (0,5 mol / l) en una proporción de volumen de 1:1. El sitio donante del sistema de diálisis se llenó con 250 ml de esa solución; se tuvo cuidado de excluir las burbujas de aire. El sitio receptor del sistema de diálisis se llenó con 250 ml de una solución de albúmina de 10%. Las bombas de rodillos transportaban un volumen de 200 ml / min a través de ambos hemisferios. Se tuvo cuidado de mantener una presión idéntica en ambas cámaras de diálisis, las diferencias entre las presiones de los hemisferios fueron niveladas por una válvula interconectada en el tubo de salida. Las diálisis se realizaron durante 55 30 min cada una. Se tomaron volúmenes de muestra después de llenar el sistema, cada 10 minutos desde el donante y el lado receptor. Las muestras acuosas se transfirieron en iso-octano y se secaron por corriente de nitrógeno. La metilación se realizó mediante la adición de metanol que contiene 2% de ácido sulfúrico y calentamiento de la muestra durante 15 minutos a 70° C. Las muestras fueron disueltas en agua e iso-octano. La fase orgánica se separó después de la centrifugación y se analizó por GC.

60 El análisis mostró que cuando la diálisis se realizó sin arginina no había cantidades o muy pequeñas de ácido oleico en las soluciones de receptor. En la diálisis realizada con arginina se produjo un aumento proporcional en el contenido de ácido oleico de la solución de receptor a la concentración de ácido oleico en la solución donante y la duración de la diálisis. Este incremento fue menor cuando se usaron membranas hidrófilas como la celulosa o poliarietersulfona, y mayor cuando se utilizaron membranas hidrófobas como PVDF y PTFE.

65 En otras configuración, se investigó la viabilidad de la electrodiálisis. Para ello, la celda del dializador descrito fue

modificada mediante la colocación de una malla de platino en ambos embudos. Estos se conectaron a un generador de alta tensión (EasyPhor, Biozyme, Alemania) a través de cables sellados que fueron puestos a través de los conectores en Y. Las diálisis se realizaron con las membranas idénticas como en los experimentos anteriores y en las mismas condiciones, pero aplicando una corriente continua variable con una tensión fija de 40V. La preparación de la muestra se realizó como se ha descrito antes. Las investigaciones se repitieron utilizando ácido esteárico y ácido linoleico. Los resultados encontrados para el ácido oleico pudieron ser confirmados.

Conclusión: La solubilización de los ácidos grasos ligados a las proteínas plasmáticas utilizando una solución de arginina y la separación de los ácidos grasos por medio de una electro-diálisis es factible.

## Ejemplo 2

### Investigación del uso de la solvatación de arginina para el análisis del contenido de ácidos grasos del plasma

Los ácidos grasos no esterificados y esterificados tienen funciones importantes en la fisiología. Sin embargo, la desproporción de los ácidos grasos esenciales es patógeno en varias enfermedades como la aterosclerosis, la hipertensión o la diabetes mellitus. Por lo tanto, hay una necesidad respecto de su determinación exacta para la prevención, el diagnóstico y control de terapia. El análisis clínico de rutina se establece sólo para la determinación de los triglicéridos. Los métodos analíticos disponibles para la determinación de los ácidos grasos volátiles en la sangre son raros y costosos. La determinación de los triglicéridos se hace por defecto. Sin embargo, los resultados sólo pueden estimar el verdadero contenido de ácidos grasos esterificados porque se determina la glicerina liberada enzimáticamente. Puesto que el contenido de ácidos grasos esterificados con glicerina puede variar, la concentración real es ambigua. Además, no existe ningún método universal para caracterizar los ácidos grasos de acuerdo con sus clases.

Se llevó a cabo una comparación de las 10 muestras de sangre entre los métodos clínicos de rutina para la determinación de la fracción de triglicéridos, el procedimiento analítico de la invención y un procedimiento de referencia. Para todas las mediciones, la sangre extraída a las personas se introdujo en un monovette de suero. Las muestras se dejaron coagular durante 20 minutos y se centrifugaron a 3000U/min durante 15 min. El plasma se separó y se homogeneizó antes de la separación de los volúmenes de muestra hasta 3 viales Eppendorf. Se usó ácido margarínico como estándar interno en las muestras utilizadas para la CG y la nano-organogel-electroforesis.

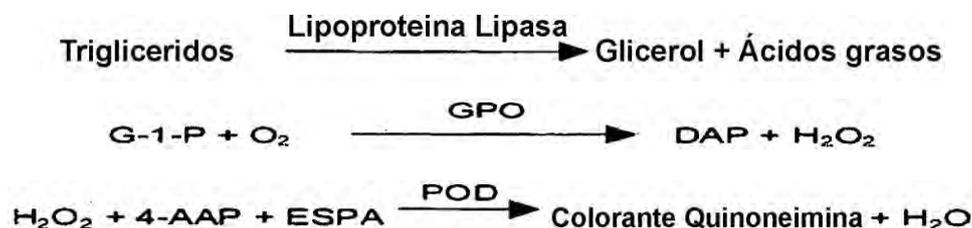
#### *Procedimiento enzimático estándar para la determinación de triglicéridos*

El procedimiento clínico se realizó mediante un ensayo enzimático estándar (Kit de Determinación de los triglicéridos en suero, Número de Catálogo TR0100, Sigma-Aldrich, EE.UU.). Las muestras se prepararon como sigue:

El reactivo de glicerol libre (0,8 ml) se pipeteó en cada cubeta y se añadió 10 ml (0,01 ml) de agua, glicerol estándar. Luego se mezclaron por inversión suave, y se incubaron durante 5 minutos a 37 ° C. Se registraron la absorbancia inicial (IA) de vacío, estándar, y la muestra a 540 nm versus el agua como referencia. El reactivo de triglicéridos reconstituido (0,2 ml) se añadió a cada cubeta, se mezcló y se continuó la incubación a 37° C durante 5 minutos más. Se registró la absorbancia final (FA) en vacío, estándar y la muestra a 540 nm versus el agua como referencia. Se calcularon las concentraciones de glicerol, triglicéridos verdaderos y triglicéridos totales en la muestra.

Las etapas de reacción se muestran abajo:

#### Reacciones Enzimáticas de Ensayo de Triglicéridos:



#### Concentración de Triglicéridos de Suero Verdadero:

Concentración de Triglicéridos de Suero Verdadero (concentración de triolein equivalente) =

$$\frac{(\text{FA}_{\text{MUESTRA}} - (\text{IA}_{\text{MUESTRA}} \times \text{F}))}{(\text{FA}_{\text{ESTANDAR}} - (\text{IA}_{\text{BLANCO}} \times \text{F}))} \times \text{Concentración de Estándar}$$

Donde  $F = 0,81/1,01 = 0,80$

Cálculos:

5 **Concentración Total de Triglicéridos en Suero o Plasma:**  
**Concentración Total de Triglicéridos de Suero (concentración de triolein equivalente) =**

$$10 \frac{(F_{\text{MUESTRA}} - F_{\text{EN BLANCO}})}{(F_{\text{ESTÁNDAR}} - F_{\text{EN BLANCO}})} \times \text{Concentración de Estándar}$$

Glicerol En Suero o Plasma:

**Concentración de Glicerol (concentración de triolein equivalente) =**

$$15 \frac{(I_{\text{MUESTRA}} - I_{\text{EN BLANCO}})}{(I_{\text{ESTÁNDAR}} - I_{\text{EN BLANCO}})} \times \text{Concentración de Estándar}$$

*Mediciones de GC de los ácidos grasos*

20 Las muestras para la determinación de GC se extrajeron según el método modificado de Folch (Folch, Lees y Stanley Sloan, 1957). En resumen, 2 gramos de una muestra se pesaron en un vaso; se añadió 10 ml de metanol BHT + 0,01%, se agitó y se sedimentó durante unos minutos. Se añadió  $\text{CHCl}_3$  (20 ml), la solución se agitó y se sedimentó durante algunas horas o durante la noche en un refrigerador bajo  $\text{N}_2$ . La solución se filtró dos veces y se añadió 7 ml de KCl y se llenó hasta 250 ml con metanol. La fracción inferior se extrajo luego por filtración a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en un tubo centrífugo grande y limpio y se evaporó el solvente. A continuación, el lípido se transfirió a un vial de GC mediante la adición de 0,5 ml de hexano BHT + 0,01% en el tubo, se agitó bien en otro lípido disolviendo, luego utilizando pipetas Pasteur todas las muestras se transfirieron a un vial de GC, el GC se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo: las muestras acuosas se transfirieron en iso-octano y se secaron por corriente de nitrógeno. La metilación se realizó mediante la adición de metanol que contiene 2% de ácido sulfúrico y el calentamiento de la muestra durante 15 minutos a  $70^\circ \text{C}$ . Las muestras fueron disueltas en agua e iso-octano. La fase orgánica se separó después de la centrifugación y se analizó por GC.

*Análisis de ácidos grasos con el procedimiento analítico de la invención*

35 El dispositivo analítico fue construido como se describe antes. En resumen, una cámara donante y una cámara analítica están separadas por una ranura para colocar el medio de separación. Los márgenes de la ranura tienen juntas que permiten un sellado completo entre las cámaras y la interfaz de separación de fases extraíble. Las cámaras para el anolito y el catolito están separadas para las cámaras donante y aceptor, respectivamente, que se encuentra en los sitios opuestos a la interfaz de separación de fases. Las cámaras de anolito y catolito están separadas para las cámaras donante y aceptor por una membrana selectiva de iones. En las cámaras de anolito y catolito, se montaron electrodos de platino (Umicor, Alemania) que se conectaron a un generador de alta tensión (EasyPhor, Biozyme, Alemania).

45 La interfaz de separación de fases desechable consiste en una junta tórica PTFE que tiene un diámetro de 2,5 cm y una profundidad de 3 mm, que se llenó hasta los márgenes con un líquido sol-gel-mezcla. El organogel se preparó como se describe en otro lugar (Suzuki et al: organogelificantes de dos componentes basados en dos L-aminoácidos: Efecto de la combinación de L-lisina con diversos L-aminoácidos en el comportamiento de la organogelificación, Langmuir, 2009, 25, 8579-8585). Después de la gelificación, ambos lados del organogel se cubrieron con una membrana de policarbonato de pista de grabado que tiene diámetros de poro de  $1,0 \mu\text{m}$  (Nucleopore, Whatman, EE.UU.), que se adhirieron a los márgenes de la junta tórica. La interfaz de separación de fases se ajustó firmemente en la ranura entre las cámaras donante y aceptor y se verificó la estanqueidad.

50 El plasma (1 ml) y 1 ml de una solución de arginina (200 mmol / l) se sometieron a vórtice durante 2 min., se incubaron durante 5 min a  $40^\circ \text{C}$  y de nuevo se sometieron a vórtice durante 2 min. Se añadieron tres lipasas comerciales (las lipasas A1 y A2 eran lipasas pregástricas y la lipasa A3 era una lipasa fúngica) disueltas en tolueno y se mezclaron suavemente durante 15 min a  $37^\circ \text{C}$ . La muestra se pesó antes y después de pipetear  $100 \mu\text{l}$ . El volumen de la pipeta se vertió en la cámara donante del dispositivo analítico. La cámara aceptora se llenó con acetonitrilo  $100 \mu\text{l}$ . Las cámaras de anolito y catolito se llenaron con una solución de arginina 100 mmol / l. Se aplicó DC a un potencial de 40 V durante 15 min. El volumen de la cámara aceptora se pipeteó y se transfirió a una sonda. La cámara aceptora se lavó con acetonitrilo  $100 \mu\text{l}$  que se añadió al volumen de la sonda. A continuación, se efectuó la medición de los ácidos grasos con un MPA espectrómetro FT-NIR (Bucker Optic, Alemania). De esas mediciones se calculó del contenido total de ácidos grasos de la muestra.

60 Resultados: La comparación de los resultados de los tres métodos de análisis muestra que (1) el método enzimático indirecto para la determinación de triglicéridos subestima la cantidad de contenido de ácidos grasos en la sangre humana cuando se compara con los dos otros métodos, (2) los resultados del procedimiento analítico de la

invención y GC para la cantidad total de ácidos grasos son los mismos, y (3) la determinación de los diversos ácidos grasos con el procedimiento analítico de la invención exhibe una alta correlación con los resultados de GC.

### Ejemplo 3

#### La investigación de la capacidad de purificación de la arginina y otros compuestos solubilizantes para el refinamiento de aceites vegetales crudos

Los aceites vegetales crudos contienen diversas cantidades de ácidos grasos no esterificados. Puesto que estos ácidos grasos reducen la estabilidad del aceite, se separan durante el procesamiento de refinamiento a valores por debajo de 0,5%. Hay dos métodos realizados en el procesamiento del aceite: saponificación y destilación. Durante estos procesos de refinamiento, pueden ocurrir alteraciones de los ácidos grasos esterificados. Se pretende por lo tanto investigar la idoneidad del método de la invención para solubilizar y separar ácidos grasos no esterificados con arginina y analizar los efectos de los procedimientos sobre la calidad de los ácidos grasos esterificados.

Se investigaron los aceites crudos de soja y colza. Para ese propósito, 10 litros de aceite crudo se vertieron en un tanque de 50 litros. Se preparó una solución de arginina molar de 0,5 añadiendo 871 g de arginina a 10 litros de agua desionizada. La arginina se disolvió mediante rotación lenta y calentando la solución a 40° C durante 2 horas. Similares investigaciones se realizaron con L-NG-monometil-arginina, ácido argininosuccínico, L-canavanina, ácido 2-guanidinoglutárico. Las soluciones se añadieron al aceite crudo y las emulsiones se agitaron durante 1 hora mientras se calentaban a 40° C. A continuación, las emulsiones se dejaron sedimentar durante 24 horas. Después, las fases acuosas se drenaron a través de un tamiz hidrófilo que no pueden pasar los triglicéridos y que se ubicó en la parte inferior cónica del tanque. Las soluciones acuosas se pesaron y se tomaron muestras de la fase orgánica y las fases acuosas. Las muestras de las fases acuosas fueron acidificadas con ácido sulfúrico a un pH de aproximadamente 3.

Las muestras de la fase orgánica se vertieron en un tubo de muestra de una unidad de valoración. Se añadió 5 ml de la fase orgánica 20 ml de una mezcla de etanol / hexano (1:1, v / v) con 3 gotas de fenolftaleína al 1% en etanol y se agitó hasta que la solución estuvo completamente clara. Después, las muestras se valoraron con KOH en etanol hasta que apareció un color rosado, lo que indica la cantidad de ácidos grasos no esterificados. El contenido de ácidos grasos se calcula de acuerdo con la fórmula

$$C_{FFA}[\text{mmol/l}] = (V_{\text{KOH}}[\text{l}] \cdot C_{\text{KOH}}[\text{mol/l}]) / V_{\text{muestra}}[\text{l}] \cdot 1000$$

$V_{\text{KOH}}/C_{\text{KOH}}$ : volumen / concentración de KOH consumido en etanol

$V_{\text{muestra}}$ : volumen aplicado de la muestra

$C_{\text{FFA}}$ : concentración de ácidos grasos libres

Las muestras de aceite comestible procedentes de la misma fuente que el aceite crudo después de la purificación industrial se analizaron en consecuencia por su contenido de ácidos grasos no esterificados.

Además, las muestras de las fases orgánicas se hidrolizaron y se analizaron por GC como se ha descrito antes.

Resultados: Los análisis mostraron que el contenido de ácidos grasos no esterificados de aceite crudo que inicialmente era de 2,0 y 2,6% se puede reducir a 0,2 y 0,6% mediante el uso de la técnica de la invención por medio de extracción fluido de fluido en combinación con la solubilización de la invención. Los valores encontrados para ácidos grasos no esterificados no fueron significativamente más bajos que aquellos después de la eliminación industrial. Además, la comparación de los ácidos grasos triglicéridos analizados por GC difiere en sus contenidos entre los métodos de extracción. En comparación con los ácidos grasos de la fase orgánica antes mencionada, los ácidos de extracción fluido-fluido del aceite purificados por saponificación mostraron una menor concentración de ácidos grasos no saturados, mientras que el contenido de ácidos grasos con el mismo número de carbonos fue aproximadamente el mismo. Por otra parte, los ácidos grasos del aceite purificados por destilación exhibieron más isómeros trans que los ácidos grasos insaturados en comparación con la extracción fluido-fluido, así como un contenido ligeramente menos general de los ácidos grasos insaturados.

### Ejemplo 4

#### Investigación de la capacidad de la arginina para disolver grandes cantidades de ácidos carboxílicos en los aceites crudos y usados.

El aceite de palma crudo tiene un contenido de ácidos grasos no esterificados de hasta 35%, y los aceites usados de hasta 40%. Para su utilización comercial, los ácidos grasos no esterificados tienen que ser eliminados. Una extracción acuosa con una solución de arginina se realizó dos veces. 10 L de cada aceite crudo se mezcló con 30 L de solución de arginina 0,5 mol / l en un depósito de L 50. La mezcla se agitó durante 15 minutos y se dejó separar durante 5 h. La fase acuosa se drenó. A continuación, el procedimiento se repitió con 10 L de una solución de arginina de 100 mmol / l. Experimentos análogos se realizaron con soluciones de 1,1-dimetilbiguanida, Arg-Gly-Asp, NG, NG-dimetilarginina, poli-L-arginina. Un análisis de los ácidos grasos se realizó de acuerdo al ejemplo 2.

El contenido de ácidos grasos no esterificados en el aceite crudo de palma y el aceite usado era 33% y 36%, respectivamente, los que fueron reducidos a una concentración final de 0,1% y 0,3 utilizando arginina para la extracción. Los otros compuestos ensayados produjeron reducciones a concentraciones finales de 0,2 a 0,5, y 0,4 a 0,9%,

respectivamente. Conclusión: Los ácidos carboxílicos se pueden separar de los aceites por soluciones acuosas de compuestos de arginina y compuestos comparativos, incluso cuando están presentes en altas concentraciones.

### Ejemplo 5

Investigación sobre la capacidad de la arginina y otros compuestos solubilizantes arginina para disolver los ácidos carboxílicos y los ingredientes del aceite crudo

Las fracciones extraíbles de aceite de plantas y vegetales contienen no triglicéridos en diversos contenidos que tienen que ser eliminados a fin de purificar el producto de aceite. Los no triglicéridos comprenden ácidos carboxílicos, pigmentos, esteroides, fosfolípidos, glicolípidos, entre otros. De ellos, los anfífilos como fosfolípidos, ácidos carboxílicos y glicolípidos se agregan a las vesículas que incorporan otros no triglicéridos. Los anfífilos se auto-ensamblan a láminas y membranas. Se investigó si el efecto de solubilización de los compuestos en las vesículas de compuestos anfífilos que contienen ácidos carboxílicos es capaz de eliminar los ácidos carboxílicos junto con los anfífilos complejos con los ácidos carboxílicos.

Los aceites crudos de girasol y maíz se agitaron vigorosamente con soluciones de arginina, ácido 4-guanidinobenzoico, cimetidina, polihexanida, y melamina (100 mmol / l; vol 1:1), respectivamente. Las fases se separaron espontáneamente dando lugar a fases acuosas turbias de oliva de color amarillo-verde y fases del aceite de color amarillo crema. Las fases acuosas se acidificaron con HCl para alcanzar un pH de 5. Los ácidos carboxílicos se extrajeron mediante la mezcla con n-hexano, que se eliminó y analizó de acuerdo con los métodos descritos anteriormente. Los resultados documentaron la presencia de ácidos grasos en los analitos sin una diferencia sustancial en su contenido entre las sustancias investigadas. Las fases acuosas restantes se analizaron adicionalmente por HP-TLC (Licrosphere). Entre las sustancias que pudieron ser identificadas estaban: fosfolípidos, pigmentos verdes, tocoferoles, fitosteroides. El contenido de fósforo total en las fases de aceite se analizó de acuerdo a FI 6 (99) DGF. El ácido libre en el aceite se determinó por titulación con una solución de KOH etanol. Se encontró que más del 90% de los ácidos grasos no esterificados se habían eliminado después de la primera extracción con las sustancias investigadas. La cantidad total calculada de los ácidos grasos extraídos se correlacionó con la cantidad calculada de los ácidos grasos recuperados de la extracción de n-hexano de las fases acuosas.

Los contenidos de fosfato de los aceites en bruto se redujeron en más de la mitad por los procedimientos de extracción acuosa con las sustancias probadas.

Conclusión: El efecto solubilizante de la arginina y otros compuestos solubilizantes se puede utilizar para liberar ácidos carboxílicos complejados en soluciones o emulsiones de aceites y anfífilos que permiten su extracción en un medio acuoso. Además, los anfífilos complejados con ácidos carboxílicos solubilizados pueden ser separados (a una fase acuosa) al mismo tiempo en gran medida.

### Ejemplo 6

Investigación de la capacidad de la arginina y otros compuestos solubilizantes para liberar, disolver y extraer ácidos carboxílicos complejados de materiales biológicos sólidos.

La mayoría de los materiales biológicos contienen ácidos carboxílicos no esterificados generalmente complejados con otros materiales orgánicos. Uno de estos materiales sólidos es el salvado de arroz que contiene ácidos grasos y aceites en hasta 35% de su peso seco. El salvado molido superfino se suspendió en 200 mmol / l de soluciones de arginina, N $\omega$ -nitro-L-arginina, octopina, ácido 2-guanidinoglutárico, y agmatina, respectivamente. Las soluciones se agitaron continuamente durante 24 horas. Las soluciones se volvieron de color gris y beige y muy turbias en todos los casos. La materia sólida se separó por filtración. Las fases acuosas que tenían un pH de entre 8-10 con las sustancias utilizadas se extrajeron con éter dietílico. Luego, las soluciones acuosas se acidificaron con ácido ascórbico con el fin de conseguir un pH de 6. Las extracciones de ácidos carboxílicos no esterificados, así como su determinación, se realizaron como en el ejemplo 5. Las fracciones extraídas con éter dietílico se secaron y pesaron. Posteriormente se disolvieron y se analizaron por TLC HP-según el ejemplo 5. Lo mismo se hizo para las soluciones acuosas residuales.

Resultados: Las fracciones de éter dietílico que contienen triglicéridos se encuentran típicamente en los aceites de arroz, el contenido no fue significativamente diferente entre las sustancias utilizadas. El peso de los triglicéridos correspondía a aproximadamente 10 - 15% del peso seco del salvado de arroz. Las fracciones de n-hexano contenían ácidos carboxílicos y en las fases acuosas residuales, pudieron identificarse anfífilos como fosfolípidos y glicolípidos, así como pigmentos.

Conclusión: Los ácidos carboxílicos con frecuencia permanecen en sólidos orgánicos que surgen durante el procesamiento de alimentos y que son comúnmente complejados con fosfolípidos y otros lípidos. Una solución acuosa de arginina y otros compuestos solubilizantes es capaz de liberar estos ácidos carboxílicos complejados, con lo que también reduce la adherencia de los fosfolípidos y otros lípidos al material sólido, permitiendo así su extracción acuosa.

### Ejemplo 7

Investigación de la capacidad de la arginina para disolver y extraer ácidos carboxílicos agregados en los aceites minerales.

Los aceites fósiles contienen cantidades significativas de ácidos carboxílicos que causan la corrosión durante el refinamiento del aceite. Por lo tanto, existe una demanda para reducir el contenido de ácidos carboxílicos. El ácido carboxílico más común en aceites minerales es el ácido nafténico. La capacidad de los compuestos de solubilización para separar el contenido de ácido carboxílico de una muestra de aceite crudo fue investigada. El aceite fue un regalo de una empresa de procesamiento de aceite y tenía una densidad de  $0,85 \text{ g}^3 / \text{cm}$ . El TAN (número de acidez total) se determinó por valoración de KOH.

Se mezcló 100 ml de aceite crudo (que contiene aproximadamente 40 ácidos carboxílicos mmol) con 200 ml de una solución de 300 mmol / l o bien arginina o ácido L-2-amino-3-guanidinopropiónico, o L-canavanina en agua durante 1 hora a  $45^\circ \text{C}$ . Las fases de cada una de las tres muestras se separaron por centrifugación. Posteriormente, la fase de aceite se mezcló con 100 ml de una solución de 100 mmol / l en agua, una vez más con arginina o ácido L-2-amino-3-guanidinopropiónico, o L-canavanina que se usó en la primera etapa durante 30 minutos a temperatura ambiente y las fases se separaron preferentemente por centrifugación. Posteriormente, se determinó el TAN de la fase de aceite.

Resultados: El TAN se redujo en las tres muestras de 1,8 mg KOH / g a 0,16 a 0,3 mg de KOH / g por la extracción acuosa con los compuestos solubilizantes.

Conclusión: El TAN del aceite crudo se puede reducir por los compuestos solubilizantes. Puesto que el ácido nafténico prevalece en los aceites crudos, una reducción significativa es posible.

### Ejemplo 8

#### Investigación de la estabilidad de los aceites en presencia de arginina y otros compuestos solubilizantes

El aceite refinado de girasol se mezcló con soluciones distintas de arginina de diferentes concentraciones y duración. Las soluciones tenían concentraciones de 100, 200, 300, y 500 mmol de arginina, histidina, citrulina H-Cit-OH, N- $\omega$ -hidroxi-L-norarginine, y L-NIL. Se añadieron en una proporción de volumen de 1:1. Todas las soluciones se agitaron vigorosamente durante 60 minutos, y después se dejaron separar por sedimentación. Una muestra para cada concentración se analizó después de 3 horas, otra después de 7 días y otra después de 14 días. Las concentraciones de ácidos grasos se determinaron como se describe en el ejemplo 2. En concentraciones de 100 y 200 mmol de arginina, la concentración de los ácidos grasos fue la misma en todas las muestras. En una concentración de 300 y 500 mmol hubo un aumento insignificante de las concentraciones de ácidos grasos, dependiendo de la concentración de arginina y la duración de la exposición.

Conclusión: la arginina y demás compuestos solubilizantes no hidrolizan los triglicéridos en concentraciones bajas o moderadas. Sin embargo, a mayores concentraciones, la hidrólisis puede ocurrir en una pequeña medida.

### Ejemplo 9

#### Investigación de la capacidad de los compuestos solubilizantes para disolver y extraer los ácidos carboxílicos del aceite durante la producción de combustible.

La producción de biodiesel se basa en la hidrólisis de los ácidos carboxílicos esterificados. Más comúnmente, la hidrólisis se lleva a cabo por las hidrolasas. Sin embargo, estas enzimas son inhibidas por sus productos de reacción. Por lo tanto es necesario eliminar la glicerina y los ácidos carboxílicos del centro activo de las enzimas.

El aparato de diálisis del ejemplo 1 se utilizó para probar la viabilidad y la eficacia de una eliminación continua de los ácidos grasos al realizar la hidrólisis de los triglicéridos del aceite de soja. La lipasa (Novozyme 435) fue inmovilizada de acuerdo con el método de Lee (Inmovilización de lipasa sobre gel de sílice usando un método de reticulación, Lee DH, Park CH, Yeo JM, y Kim SW, J. Ind. Eng. Chem., vol. 12, No. 5, (2006) 777-782). 150 ml de aceite de soja refinado y 50 ml de arginina, solución H-homoarginina-OH, o polihexanida (100 mmol / l) se agitaron vigorosamente y se introdujeron en la cámara de reacción. El sistema de circulación hace circular constantemente la emulsión a una velocidad que no permite la separación de fases. Un filtro PTFE con un tamaño de exclusión de  $0,4 \mu\text{m}$  fue montado en la salida en forma de embudo de la cámara donante / reacción con el fin de retener perlas de sílice en la cámara mientras circula la solución de reacción. La cámara aceptora, y el sistema de circulación se llenaron con un 200 mmol / l de solución del compuesto respectivo. Se usó una membrana de separación de PTFE montada entre las cámaras de reacción / donante y aceptora. Se aplicó DC entre la cámara de reacción y la cámara aceptora, durante el proceso de hidrólisis, como en el ejemplo 1. La solución en la cámara aceptora se distribuyó continuamente y se tomaron muestras cada 10 minutos. El proceso se paró después de 30 minutos. 82% del contenido de ácidos grasos calculados de los triglicéridos sometidos a hidrólisis estaba presente en la cámara aceptora. La solución de la cámara aceptora se separó y se acidificó con HCl a un pH de 4. Los ácidos grasos se separaron por extracción de n-hexano. La fase de hexano separada (10 ml) se mezcló con 2 ml de metanol. Se añadió novozima 435 inmovilizada en sílice como se ha descrito antes. La reacción de esterificación se detuvo después de 30 minutos por filtración de la solución. La solución se agitó vigorosamente con una solución de 50 mmol / l de la sustancia solubilizante utilizada en el paso anterior. La fase orgánica se separó después de la separación de fases y se remitió a un evaporador rotatorio para destilar metanol y hexano residuales.

Resultados: Se observó un rápido aumento en la concentración de ácidos grasos en las solucionesceptoras hasta un nivel estable. No se encontraron mono-, di-, o triglicéridos o glicerina en las soluciones de aceptor. Los ácidos grasos que habían pasado a la cámara aceptora pudieron ser purificados de los aniones solubles en agua que habían pasado

también por acidificación y extracción con solvente. Los ácidos grasos purificados fueron esterificados en un medio no acuoso por esterasas inmovilizadas. Los ácidos grasos no convertidos se eliminaron mediante una extracción acuosa con los compuestos solubilizantes. La evaporación del alcohol y el solvente resultó en una solución altamente purificada de éster metílico de ácido graso con una pureza de > 98%.

5 Conclusiones: La hidrólisis de los ácidos grasos esterificados en una solución de arginina es factible, mejorando así la convección de los ácidos grasos libres y con ello las condiciones del proceso. Los ácidos grasos hidrolizados puede ser purificados adicionalmente mediante soluciones de los compuestos de solubilización y conducidos a un medio de  
10 reacción no acuoso para la metilesterificación (es decir, la formación de un éster de metilo). Además, los ácidos carboxílicos no reactivos se pueden eliminar en una etapa de purificación final usando una solución acuosa de compuestos solubilizantes. Ésteres metílicos de ácidos grasos altamente purificados se produjeron después de la evaporación del solvente, sin necesidad de la separación por destilación de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

### Ejemplo 10

15 Investigación de la capacidad de los compuestos solubilizantes para disolver sustancias poco solubles en soluciones acuosas.

Muchos de los substratos de reacción o componentes de reacción tienen que estar presentes en un medio acuoso en una forma no complejada, especialmente de sistemas biológicos. La nanoemulsificación de sustancias mejoró su accesibilidad a los mecanismos de transporte y las reacciones biológicas. Sin embargo, muchos sistemas portadores anfífilos presentan una toxicidad biológica o baja bio-compatibilidad. Muchos de los compuestos solubilizantes son biocompatibles. Por lo tanto, la capacidad emulsionante de las micro- o nanoemulsiones de estos compuestos y los ácidos carboxílicos se investigaron en sustancias poco solubles (mg soluble en agua), como tetrafenilporfirina (2 mg / l), Sudán rojo (insoluble), azoxistrobina (6.7mg / l), co-ftalocianina (insoluble), clorprofam (110 mg / l).

25 Las sustancias investigadas fueron disueltas primero en un solvente orgánico: tetrafenilporfirina en diclorometano (50mg/ml), Sudán rojo en acetona (2mg/ml), azoxistrobina en tolueno (50mg/ml), co-ftalocianina en acetonitrilo (2mg/ml), clorprofam en etanol (50mg/ml).

30 Las nanoemulsiones (50 ml) de ácido oleico (50 mmol / l) y arginina (80 mmol), ácido linoleico (50 mmoles) y L-2-amino-3-guanidinopropiónico ácido (100 mmoles), y 12-hidroxi-9-octadeceno ácido (50 mg) y Nω-nitro-L-arginina (130 mmol) se disolvieron en el medio orgánico que contiene las sustancias completamente solubilizadas. La mezcla se agitó vigorosamente. El solvente orgánico se evaporó lentamente mientras se agitaba a temperatura ambiente o temperaturas de hasta 50° C. Las nanoemulsiones respectivas se añadieron hasta que la solución se hizo transparente, o hasta un volumen de 100 ml. Las soluciones se analizaron en cuanto a la transparencia y los sólidos residuales inmediatamente y  
35 después de 24 hrs.

Resultados: Las sustancias poco solubles en agua investigadas podrían ser emulsionadas en un medio acuoso debido a nano-separaciones después de pre-disolver en un solvente orgánico apropiado. Las sustancias nanoemulsificadas sin solventes produjeron emulsiones transparentes sin formación sólida residual.

40 Conclusión: las micro- y nanoemulsiones de compuestos solubilizantes y ácidos carboxílicos pueden establecer la micro- o nanoemulsificación acuosa de sustancias poco solubles en agua, produciendo un transporte biocompatible o sistema de soporte para dichas sustancias en el medio acuoso.

### Ejemplo 11

45 Investigación de micro o nanoemulsificación de ácidos carboxílicos para permitir reacciones químicas alternativas

Los ácidos carboxílicos hidrófobos necesitan ser disueltos en solventes para permitir muchas reacciones químicas, como peroxidación o polimerización. Dado que muchas de estas reacciones pueden realizarse en medios acuosos, libres de solventes, los procedimientos serían ventajosos. Las moléculas nano-separadas hacen que los reactantes puedan reaccionar. Si los ácidos carboxílicos nano-separados con arginina u otras sustancias solubilizantes pueden ser utilizados para permitir reacciones químicas generalmente realizadas en solventes orgánicos se probó en dos experimentos.

55 Para probar la capacidad de los ácidos carboxílicos microemulsionados para reaccionar con peróxidos por esterificación enzimática, se disolvió 200 mmol de ácido 2-etilhexanoico y ácido 4-guanidinobutírico (1,5 equivalentes molares) en una mezcla de agua y THF a temperatura ambiente. Se añadió tert butilhidroperóxido (200 mmol / l) y se agitó suavemente. La solución se calentó a 45° C y se añadió una suspensión de 40 mg de lipasa PS con el fin de permitir una reacción de condensación del tert-butilperoxo-2-etilhexanoato. La reacción se terminó después de 1 h. La tasa de rotación se calculó por la fracción de peróxido todavía presente, según cálculo del análisis yodométrico. Repetidas investigaciones produjeron una tasa de rotación de 65 - 72%. Los experimentos se repitieron con agmantina y ácido 6-guanidinohexanoico. La tasa de rotación respectiva osciló entre 55-78%.

65 Una nanoemulsión de 50 mmol / l de ácido de perilla y 60 mmol / l de arginina en agua / THF (9:1 vol: vol) se mezcló con 2. eq. m-CPBA en 3 alícuotas a 25 ° C durante 3 h, y se agitó durante 12 h. La mezcla de reacción se acidificó a un pH de 4, se extrajo 3 veces con CHCl<sub>3</sub>. La fase orgánica fue secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó hasta 10 ml y se midió un GC. Rendimiento de 65% por GC. Este procedimiento se aplicó también al ácido geranio, ácido citronela, ácido oleílico,

ácido linólico, utilizando arginina, 1,1-dimetilbiguanida y, N- $\omega$ -hidroxi-L-arginina como compuestos solubilizantes. El rendimiento osciló entre el 45-85%.

Conclusión: Los ácidos carboxílicos nanoemulsificados que usan las sustancias solubilizantes permiten reacciones químicas en medios acuosos sin necesidad de un solvente.

5

### Ejemplo 12

#### Investigación de la solubilidad de diversos ácidos carboxílicos en un medio acuoso por arginina y otros compuestos solubilizantes.

10

Varios compuestos solubilizantes fueron probados en medio acuoso por su potencial para solubilizar un ácido graso de referencia, a saber ácido oleico.

15

Al principio, se probó la influencia del pH sobre la solubilidad del ácido oleico en medio acuoso. Estos ensayos se realizaron con el fin de excluir la posibilidad de que la solubilidad observada del ácido oleico fuese debido a los cambios de pH y no principalmente a causa de la interacción de grupos funcionales.

20

Las pruebas mostraron que no hay interacción entre el ácido oleico y la solución en un intervalo de pH de 9 a 12 a temperatura ambiente. A partir de pH 13, el ácido oleico comienza a disolverse. A pH 14, la adición de ácido oleico condujo a la formación de un precipitado sólido. En las pruebas siguientes, el ácido oleico se mezcló con las sustancias de ensayo en H<sub>2</sub>O. Posteriormente, el logP y el pH se midieron y la solubilidad de la sustancia de ensayo en H<sub>2</sub>O se calculó junto con una estimación de la interacción entre el ácido oleico y la sustancia de ensayo de acuerdo con el esquema que se muestra a continuación.

25

Las soluciones de los compuestos de solubilización en agua se prepararon en una concentración de 6 a 600 mmol / l, y preferentemente de aproximadamente 60 mmol / l. Para las soluciones acuosas de los compuestos solubilizantes, se añadió y se mezcló 0,833 equivalentes molares de ácido oleico o un ácido carboxílico respectivo. Las soluciones se reposaron durante 1 hora y se midió el pH. En caso de disolución incompleta y un pH por debajo de 7, se añadió una solución de 1 M de NaOH gota a gota hasta que la turbidez se disolvió. A continuación, las mezclas fueron agitadas o sacudidas. Con el fin de evaluar la estabilidad de la micro o nanoemulsión obtenida, la solución se calentó durante 1 hora a 60 ° C y se enfrió a temperatura ambiente. Otra parte de la solución clara se almacenó durante la noche a 4 ° C y luego se volvió a calentar a temperatura ambiente. Posteriormente se analizaron las soluciones en cuanto a la formación de sólido, aceite residual, viscosidad, turbiedad, y se realizaron las mediciones DLS.

30

35

En las emulsiones se forman micelas o vesículas. Su tamaño y volumen pueden ser heterogéneos. En las micro y nanoemulsiones sólo el conjunto de tamaños de vesículas prevalece. La distribución respectiva y su frecuencia relativa pueden ser medidas por dispersión de luz láser dinámica (DLS), que se llevó a cabo en las muestras que mostraban un comportamiento de solubilización micro- o nanoemulsificante para el ácido oleico. Para las mediciones DLS se usó un Zetasizer Nano S de Malvern (EE.UU.). Todas las mediciones se repitieron tres veces sin diluir o 1:10 y 1:100 diluido en agua. Para las mediciones, se usó la viscosidad del agua y el índice de refracción del agua. Se pudo demostrar que todos los compuestos solubilizantes utilizados causaban la solubilización de los ácidos carboxílicos lipófilos en agua.

40

45

La columna "compuesto de solubilización" en la Tabla A indica la forma del compuesto solubilizante disuelto en agua. Si, por ejemplo "clorhidrato" se indica, la sal de hidrocloreuro se disolvió en agua. Sin embargo, en el pH utilizado para la solubilización del ácido carboxílico, el compuesto solubilizante puede ya no estar en la forma de la sal clorhidrato. Así, la columna de "compuesto de solubilización" indica el material de partida y no la forma activa del compuesto solubilizante que es capaz de emulsionar el ácido carboxílico en el medio acuoso.

50

Máximo por intensidad: El tamaño se determina directamente a partir de la medición sin una ponderación del volumen o número de partículas.

50

Los máximos se presentan correspondientes a su porcentaje en la muestra.

Proporción del máximo: Distribución porcentual de tamaños de partículas.

55

Estimación de la solubilidad:

X	=	el compuesto se disuelve completamente	
(X)	=	el compuesto se disuelve parcialmente	
((X))	=	el compuesto no se disuelve (aspecto visual) pero no hay un cambio en	el pH. Por lo
		tanto, se supone que al menos una pequeña parte se disuelve.	
-	=	insoluble	

60

Estimación de la interacción entre el ácido oleico y la sustancia de ensayo:

65

X	=	Interacción entre el ácido oleico y la sustancia de ensayo
(X)	=	Interacción entre el ácido oleico y la sustancia de ensayo. Hay significativamente menos

ácido oleico que agua en solución.

E = Emulsión  
 S = Formación de un precipitado sólido  
 E, S = La solución se vuelve turbia, seguido por la formación de un precipitado sólido  
 n. d. = no determinado

Tabla A

Compuesto Solubilizante	Disuelto (H2O)	log P	pH	Interacción con ácido oleico	Tamaño medio por Intensidad [Nm]	Parte [%]
<b>Aminoácidos</b>						
L-2-amino-3-guanidinopropiónico ácido hidrocloreuro	X	- 3,8094	11,05	X, E	113	87,2
L-Arginina	X	- 3,517	10,20	X, E	145	99,0
L-lisina	X	-3,424	9,56	X, E	133	95,6
L-NIL	X	- 3,517	9,12	X, E	349	94,1
H-Homoarg-OH	X	- 4,264	8,66	X, E	107	68,5
Histidina monohidrato de hidrocloreuro	X	- 4,367	9,30	X, E	647	81,9
<b>Arginina derivados</b>						
N-ω-nitro-L-arginina	X	- 5,2386	11,95	X, E	85,5	46,7
N-ω-hidroxi-L-norarginina	X	- 3,98584	9,51	X, E, S	325	93,9
D-arginina metil éster dihidrocloreuro	X	- 2,1082	11,35	X, S	n.d.	n.d.
N - ω-monometil-L-arginina acetato	X	- 4,044	8,49	X, E	n.d.	n.d.
NG, NG-dimetilarginina dihidrocloreuro	X	- 3,752	9,45	X, E	22,9	87,4
D-(+)-octopina		- 4,0096	6,70	X, E	435	94,7
Ácido Argininosuccinico disodio hidrato de sal	X	- 2,50212	9,93	X, E	721	74,6
L-canavanina base libre	X	- 3,98584	8,67 9,04	(X), S, E X, E	n.d.	n.d.
<b>Derivados de guanidina de ácidos carboxílicos</b>						
Creatina	X	- 0,8842	8,32 10,01	(X), E (X), E	n.d.	n.d.
Guanidina acético ácido	((X))	- 2,387	6,20	(X), E / S	n.d.	n.d.
Ácido 3-guanidinopropiónico	X	- 3,765	11,71	X, E	153	64,7
4 Guanidinobutírico ácido	X	- 3,443	10,41	X, E	n.d.	n.d.
4 - (4,5-dihidro-1H-imidazol-2-ilamino)-butírico	X	- 1,601	8,63 / 11,5	X, E	627	58,9
(S) - (-)-2-Guanidinoglutarico ácido	X	- 3,1378	10,15	X, E	n.d.	n.d.
6 Guanidinohexanoico ácido	(X)	- 3,604	9,01	(X), E	n.d.	n.d.
4 guanidinobenzoico ácido hidrocloreuro	(X)	0,6036	11,19	X, E	n.d.	n.d.
<b>Derivados de guanidina</b>						
Guanidinehidrocloreuri	X	- 1,03	12,71	X, E	n.d.	n.d.
Sulfaguanidina	((X))	- 1,242	8,25	X, S	n.d.	n.d.
Sulfato Agmatin	X	- 1,811	10,53	X, S	n.d.	n.d.
1,3-Di-o-tolil-guanidina	((X))	3,008	nótese bien	X, S	723	73,5
Clotianidina	(X)	- 2,02559	9,81	X, E	153	53,9
N-Guanilurea sulfato hidrato de sal	X	3,541	8,93	X, E	n.d.	n.d.
Cimetidina	((X))	0,19022	9,54	X, E	239	67,2

<b>Biguanidina derivados</b>							
5	1 - (o-tolil) biguanida	(X)	1,414	11,53	X, E	850	95,5
	La clorhexidina diacetato	(X)	6,18	6,51	X, S	n.d.	n.d.
	La clorhexidina diacetato	(X)	6,18	9,58	X, S	n.d.	n.d.
	1,1-dimetilbiguanida clorhidrato (97%)	X	- 1,633	9,20	X, E	106	89,4
10	Hidrocloruro de proguanil	(X)	2,532	7,66	X, E	n.d.	n.d.
<b>Polímeros</b>							
(** = Valores de log P se calculan sobre la base de las unidades de monómero)							
	Polihexanida -5% (2300 bis 3100 MW)	X	2,78 **	5,61	X, S	n.d.	n.d.
15	Polihexanida -5% (2300 bis 3100 MW)	X	2,798 **	8,61	X, S	n.d.	n.d.
	Poli-L-arginina HCl (70.000-150.000MW)	X	- 1,32 **	11,37	X, S	n.d.	n.d.
<b>Otros compuestos</b>							
20	Diminazeno aceturato (básico)	X	0,90535	8,07	X, S, (E)	426	60,7
	Compuesto comparativo DL-N-Acetilhomocisteína tiolactona (básico)	X	- 0,4908	10,70	-	n.d.	n.d.
	Melamina	(X)	- 0,96075	8,25	X, S	n.d.	n.d.
25	4 - (4,6-diamino-2 ,2-dimetil-2H-[1,3,5] triazina-1-il	(X)	0,2952	11,28	X, E, S	n.d.	n.d.
	Compuesto comparativo Urea	X	- 3	8,59	RT: - 60 ° C: ((X))	341	96,3
	Imidazol	X	- 0,67	9,50	X, E / S	244	84,6
30	Metilimidazol	X	- 0,43	8,90	X, E / S	224	96,7
<b>Di, tri y tetrapéptidos</b>							
	Tyr-Arg (acetato de quitorfina)	X	- 4,0044	8,54	X, E	n.d.	n.d.
	Arg-Gln clorhidrato	X	- 6,5634	8,15	X, E	n.d.	n.d.
35	Gly-Arg	X	- 5,0644	9,18	X, E	n.d.	n.d.
	Arg-Phe	X	- 3,3374	8,39	X, E / S	n.d.	n.d.
	Arg-Glu	X	- 7,9134	8,83	X, E	191	97,7
	Lys-Arg acetato	X	- 5,0554	11,93	X, E	254	89,9
	His-Arg	X	- 5,7384	8,39	X, E / S	265	69,0
40	Arg-Gly-Asp (RGD)	X	- 8,2394	6,04	(X), E	n.d.	n.d.
	Arg-Gly-Asp (RGD) - básico	X	- 8,2394	8,25	X, E	220	96,9
	Arg-Phe-Ala acetato	X	- 3,595	8,25	X, E	223	90,0
	Thr-Lys-Pro-Arg (tuftsina)	X	- 3,982	8,68	X, E	174	96,3
	Gly-Gly-Tyr-Arg	X	- 6,77304	8,57	X, E	n.d.	n.d.
45	<b>Otros</b>						
	Compuesto comparativo Ácido aminofenilacético	(X)	0,73	9,23	((X))	n.d.	n.d.
	Compuesto comparativo L-Glutamina	(X)	- 2,05	8,37	((X))	n.d.	n.d.
50	Compuesto comparativo Gly-Phe	X	- 0,65	7,25	((X))	834	86,3
	Compuesto comparativo Ácido 4-aminobutírico	X	- 0,82	8,57	((X))	n.d.	n.d.
55	Gly-His	X	- 2,42	12,1	X, E	n.d.	n.d.

Los compuestos solubilizantes siguientes (A) a (T)

60 L-arginina (A), L-2-amino-3-guanidinopropiónico ácido (B), L-NIL (C), N- $\omega$ -nitro-L-arginina (D), NG, NG-dimetilarginina (E), agmatin (F), el 1,1-dimetilbiguanida (G), L-canavanina (H), ácido argininosuccínico (I), octopina (J), n $\omega$ -Monometil-L-Arginina (K), arginina metiléster (L), N- $\omega$ -hidroxi-L-arginina (M), histidina (N), H-homoarginina-OH (O), L-2-amino-3 -guanidinopropiónico (P), ácido 6-guanidinoheptanoico (Q), N- $\omega$ -hidroxi-L-norarginine (R), ácido 4-guanidinobenzoico (S) y polihexanida (T)

65 fueron cada uno utilizado para solubilizar los ácidos carboxílicos siguientes (I) a ():

ácido hexadecaicoico (I), ácido eicosanoico (II), ácido esteárico (III), docosapentaen-oico (IV), benzoico (V), ácido cafeico (VI), ácido tereftálico (VII), ácido nafténico (VIII), el ácido perfluorooctanoico (IX), ácido eicosapentaenoico (20:5) (X), el ácido linolénico (18:3) (XI ), y ácido docosapentaenoico (22:05) (XII).

5

Todos los ácidos carboxílicos pueden ser solubilizados con el compuesto de solubilización respectivo utilizado en 1,5 moles equivalentes a valores de pH entre 8 y 10 como se muestra en la Tabla B a continuación:

10

Tabla B: X: Compuesto completamente disuelto (X): Compuesto parcialmente disuelto

	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)	(XI)	(XII)
(A)	X	X	X	X	(X)	X	X	X	X	X	X	X
(B)	X	X	(X)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(C)	X	X	X	(X)	X	X	X	X	X	X	X	X
(D)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(E)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(F)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(G)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(H)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(I)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(J)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(K)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(L)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(M)	X	X	X	X	X	X	(X)	X	X	X	X	X
(N)	X	X	X	(X)	X	X	X	X	X	X	X	X
(O)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(P)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(Q)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	(X)	X	X
(R)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(S)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
(T)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**Reivindicaciones**

- 5 1. Un método para la solubilización y separación de ácidos carboxílicos con un compuesto solubilizante a partir de soluciones, emulsiones, suspensiones acuosas u orgánicas resultantes de terapia médica, análisis médicos, análisis de alimentos, procesamiento de alimentos, procesamiento de aceite, análisis de aceite, procesamiento de combustible, modulación de reacciones químicas o fisicoquímicas, solubilización de moléculas poco solubles, análisis de productos farmacéuticos o químicos de la industria o la ciencia, eliminación de los ácidos carboxílicos de aguas residuales de limpiezas privadas, comerciales o industriales, eliminación de los ácidos carboxílicos de procesos de biorreactores, organogelación o nanoemulsificación de ácidos carboxílicos, en el que dicho compuesto solubilizante contiene al menos un grupo amidino y/o al menos un grupo guanidino y en el que el compuesto solubilizante tiene un coeficiente de partición entre n-octanol y agua de  $K_{ow} < 6.30$ , y en el que el método comprende los pasos siguientes:
- 10
- 15 i) Proporcionar la solución o emulsión o suspensión que contiene los ácidos carboxílicos;  
 ii) La adición de al menos cantidades equimolares de por lo menos un compuesto solubilizante;  
 iii) Separar los ácidos carboxílicos solubilizados de la solución o emulsión o suspensión por separación de fases, filtración, nanofiltración, diálisis, absorción, complejación, electroforesis, evaporación, destilación y/o extracción.
- 20 2. Un método, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa iii) se logra por medio de uno de los siguientes métodos de separación o una combinación de los mismos:
- 25 pasar los ácidos carboxílicos por separado o juntos con al menos un compuesto solubilizante a través de una membrana de separación o un tubo o montaje capilar hueco mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente físico-químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos, o  
 realizar la separación de fases mediante la combinación de dos o más separaciones de fases de construcción de medios, o  
 pasar los ácidos carboxílicos junto con al menos un compuesto solubilizante a través de una interfaz de separación de fases que permite el paso de dichos ácidos carboxílicos y dicho al menos un compuesto de solubilización mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente físico-químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos, en donde la interfaz de separación de fases consiste en un gel, un organogel o un material sólido o una combinación de los mismos, o  
 30 filtrar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 nano-filtrar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 dializar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 adsorber los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 35 complejar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 destilar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización, o  
 separar los ácidos carboxílicos mediante el uso de al menos un compuesto de solubilización por extracción con fluido supercrítico.
- 40
- 45 3. Un método, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los siguientes pasos:
- a) Preparar dicha solución mediante la reducción de la fuerza iónica por medio de la complejación, adsorción, separación o diálisis de cationes y aniones ligada y no ligada;  
 b) Ajustar el pH de la solución por medio de la adición de un ácido o una base;  
 50 c1) Ajustar la molaridad del compuesto de solubilización para que esté en el rango de 1:10-20:01 en comparación con la concentración estimada de los ácidos carboxílicos que se van a solubilizar; y  
 d) Agregar dicho compuesto solubilizante en forma sólida o en una solución a dicha solución acuosa u orgánica que contiene el ácido carboxílico para la generación de una micro- o nano-emulsión;
- 55 opcionalmente comprende cualquiera de los pasos
- a1) liberar los ácidos carboxílicos ligados por complejación o ligamiento covalente  
 c2) Si el compuesto de solubilización se administra en una solución, ajustar el pH de dicha solución con el fin de optimizar las condiciones de compatibilidad y reacción con los ácidos carboxílicos que se van a solubilizar por medio de acidificación o alcanización;  
 60 e) Adición de esterasas, hidrolasas o un reforzador complejo;  
 f) Adición de agua y/o un co-solvente a la solución, y/o  
 g) Optimización de las condiciones de reacción por medio de calentamiento y/o mezcla de la solución, generando con ello una micro- o nano-emulsión mejorada.
- 65 4. Un método, de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además, los pasos después del paso g):

g2) Conducir la solución reactiva desde una primera cámara a una segunda cámara a través de un panel de separación usando la técnica de nano-filtración mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de éstos;

5

opcionalmente comprende los pasos

h) Eliminar los asociados de ácido carboxílico y compuesto de solubilización de la solución filtrada a través de la convección de una solución de aceptor que se conduce a través de una entrada a dicha segunda cámara y que puede fluir fuera a través de una salida de dicha segunda cámara; y

10

i) Eliminar la solución purificada de dicha segunda cámara a través de una salida adicional.

**5.** Un método, de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la solución acuosa es la muestra de sangre *ex vivo* de un sujeto del cual se eliminan micro y/o nano-emulsiones de ácidos grasos de la sangre, que comprende adicionalmente los siguientes pasos g1) a m) después del paso g):

15

g1) Liberar los ácidos grasos esterificados en la sangre de un sujeto por hidrolasas inmovilizados sobre materiales de soporte en el interior de dicha primera cámara generando así una micro- o nano-emulsión;

h) Bombear la solución filtrada desde dicha segunda cámara a una primera cámara de un segundo dializador;

20

i) Conducir la solución que contiene el ácido carboxílico desde dicha primera cámara del segundo dializador a una segunda cámara del segundo dializador a través de un segundo panel de separación mediante la aplicación de un gradiente de concentración, un gradiente químico, un gradiente neumático, un gradiente eléctrico o una combinación de los mismos;

j) Eliminar los asociados de ácido carboxílico y compuesto de solubilización que pasan a través de dicho segundo panel de separación por medio de una circulación terciaria;

25

k) Bombear la solución de aceptor de ácido carboxílico desde un recipiente de almacenamiento de la solución de aceptor en dicha segunda cámara del segundo dializador;

l) Eliminar la solución de aceptor de ácido carboxílico cargada en un recipiente de residuos, y

30

m) Reconducir la solución purificada que contiene el compuesto de solubilización que sale de dicha primera cámara del segundo dializador a la entrada de dicha segunda cámara del primer dializador.

**6.** Un método, de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el efecto se alcanza por medio de diálisis, hemofiltración, hemoperfusión, separación centrífuga de plasma, aféresis de plasma, filtración en cascada y termo-filtración:

35

**7.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que la indicación médica para aplicar dicho método se selecciona de diabetes mellitus, síndrome metabólico, sobrepeso, obesidad, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia, hipercolesterinemia, hiperuricemia, celulitis, aterosclerosis, hígado graso, lipomatosis, extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular y fibrilación supraventricular.

40

**8.** Un método, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución que se purifica surge de plantas, organismos, materiales fósiles, mezclas de reacción natural o sintética.

**9.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el uso de dicho compuesto de solubilización lleva a la micro- o nanoemulsión de dichos ácidos carboxílicos y permite su separación por medio de la complejación, adsorción, absorción, difusión, ósmosis, diálisis, filtración, nanofiltración, destilación, extracción fluido-fluido o extracción de fluidos supercrítica usando un gradiente de concentración, un gradiente térmico, un gradiente eléctrico, un gradiente fisico-químico o una combinación de los mismos.

45

**10.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el al menos un compuesto de solubilización se añade a una emulsión, solución o suspensión que contiene los ácidos carboxílicos para usar dicha emulsión para liberar, descomplejar, desunir, reaccionar, agregar, complejar, coagular, flocular, sedimentar o separar los complejos que contienen los ácidos carboxílicos.

50

**11.** Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que las micro- o nanoemulsiones se usan para disminuir una reacción físico-química o química, permitiendo, potenciando la captación y transporte de los productos o componentes de la reacción en procesos de reacciones biológicas o químicas, desuniendo, solubilizando, liberando, conveccionando, transportando sustancias por la captación de vesículas o permitiendo o potenciando la penetración de ácidos carboxílicos emulsionados a través de medios o sólidos hidrófilos o anfífilos.

55

60

65

Fig. 1

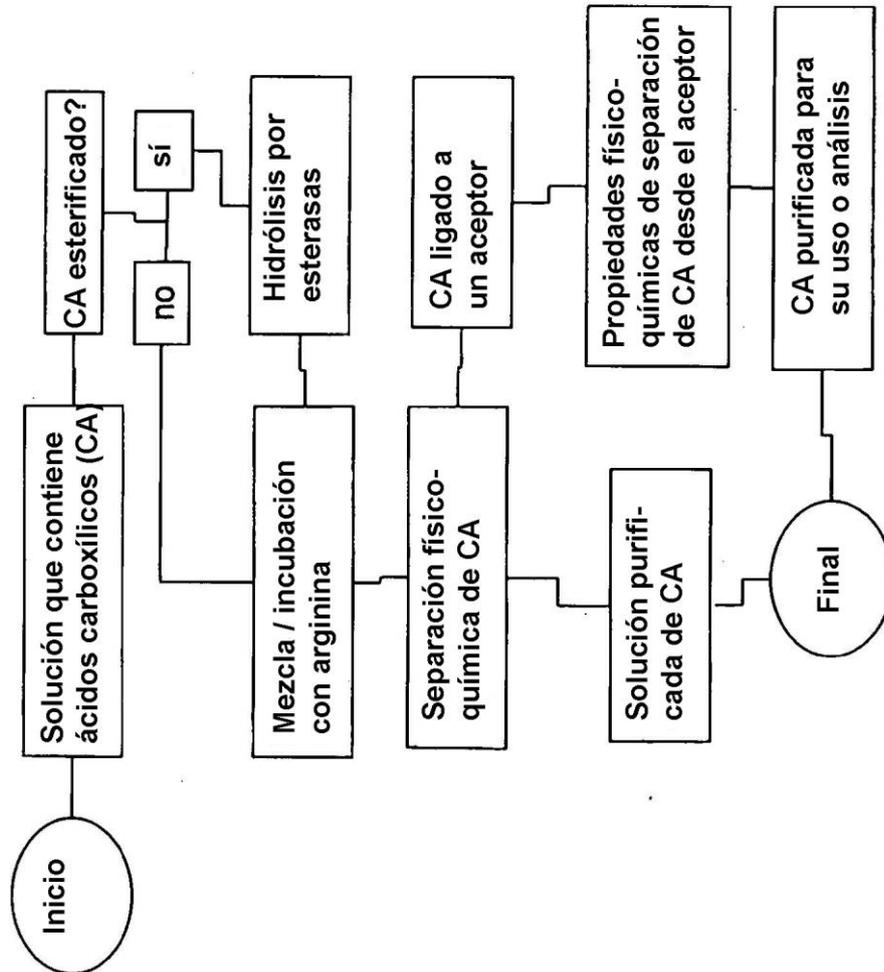


Fig. 3

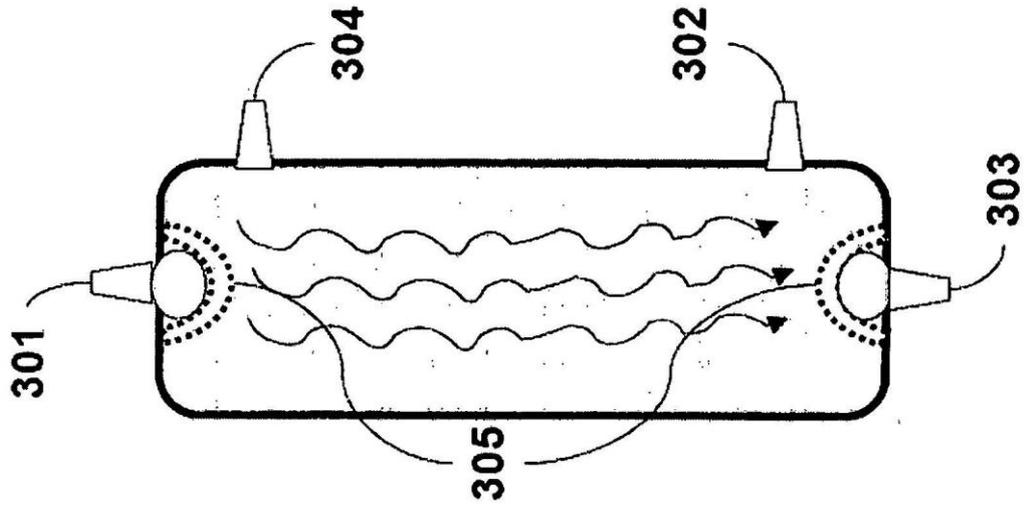


Fig. 2

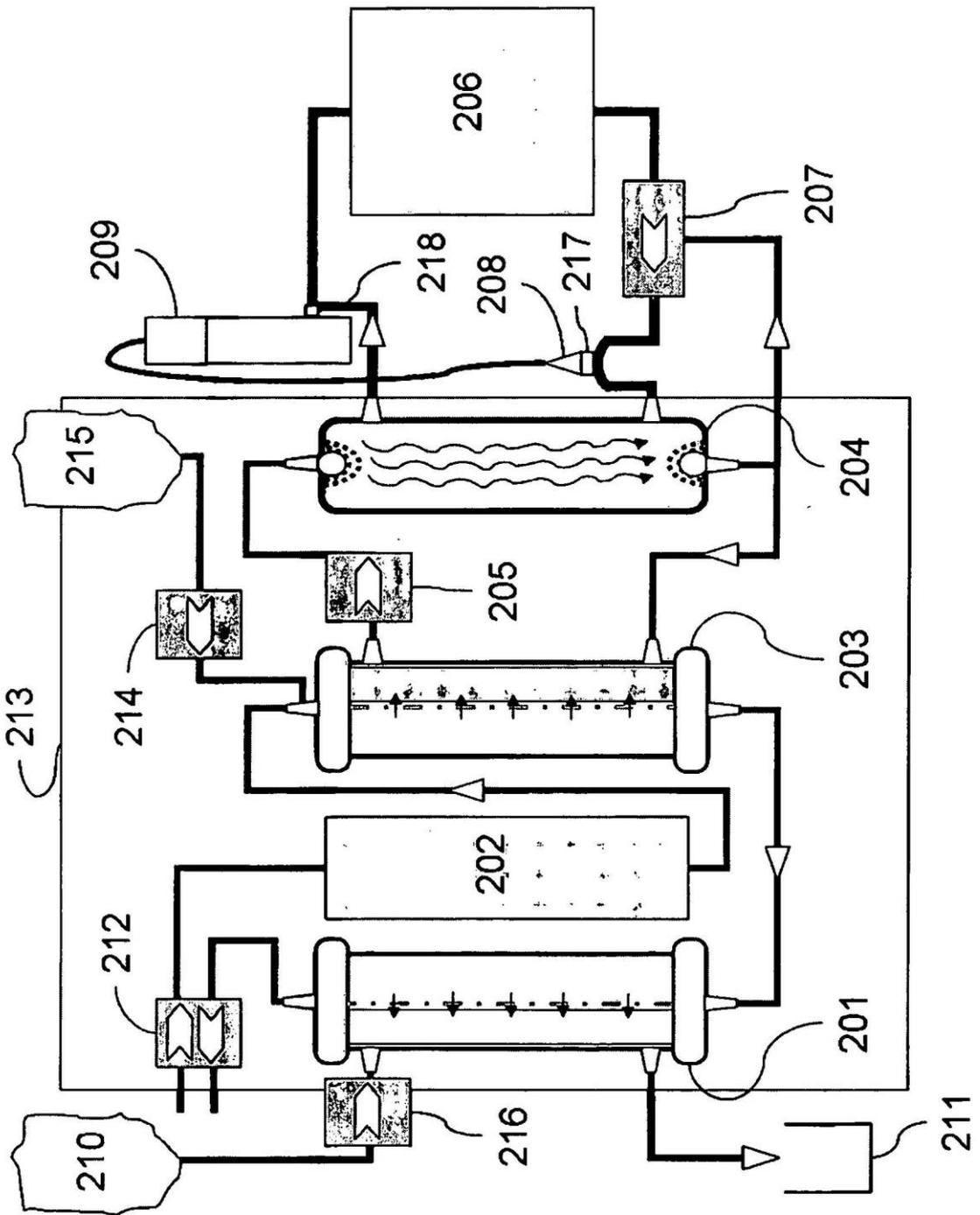


Fig.4

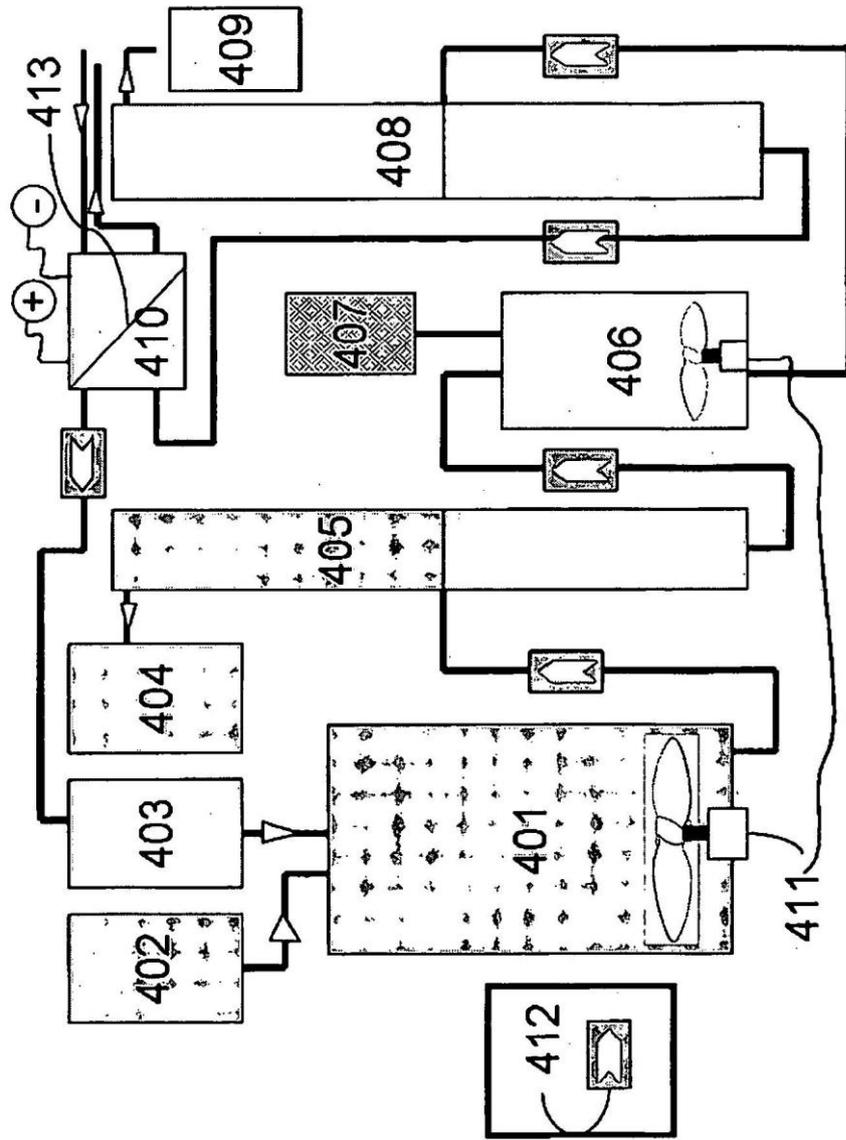


Fig.5

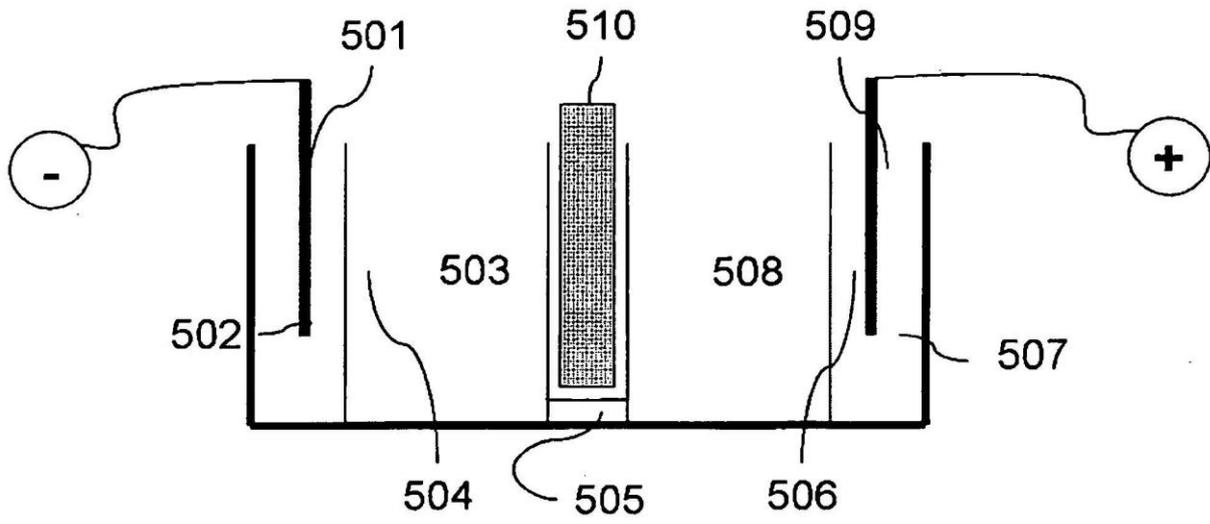


Fig.6

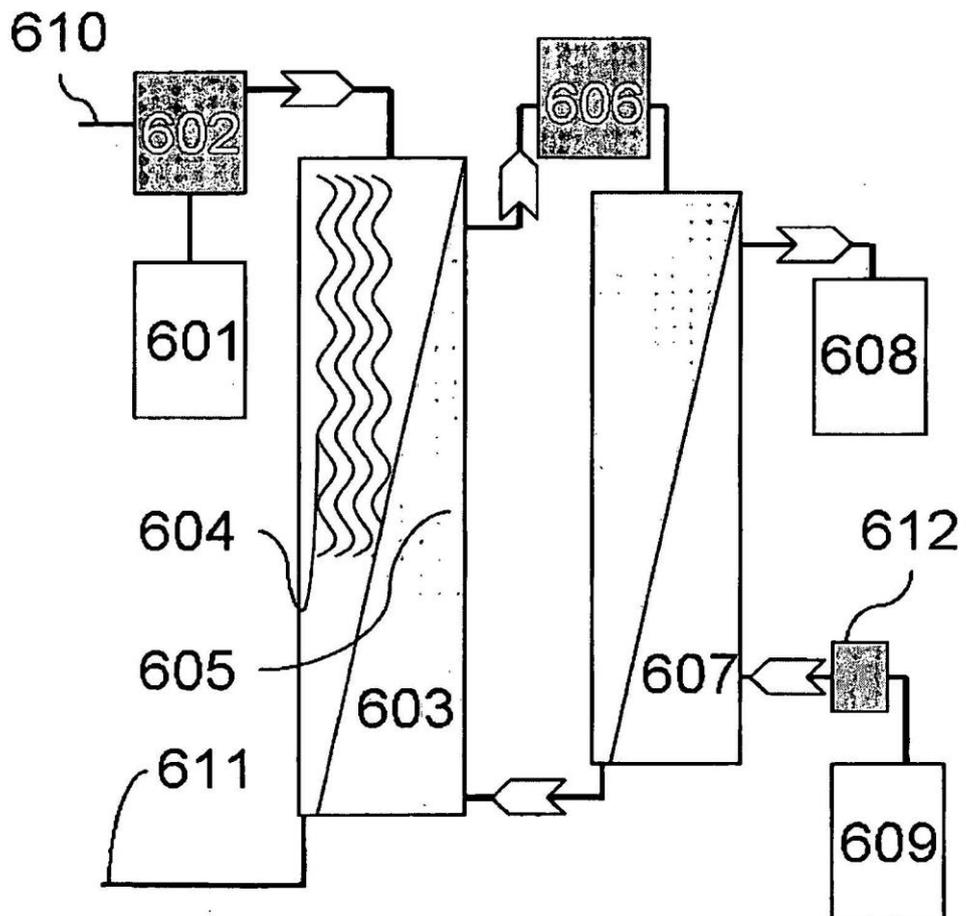


Fig.7

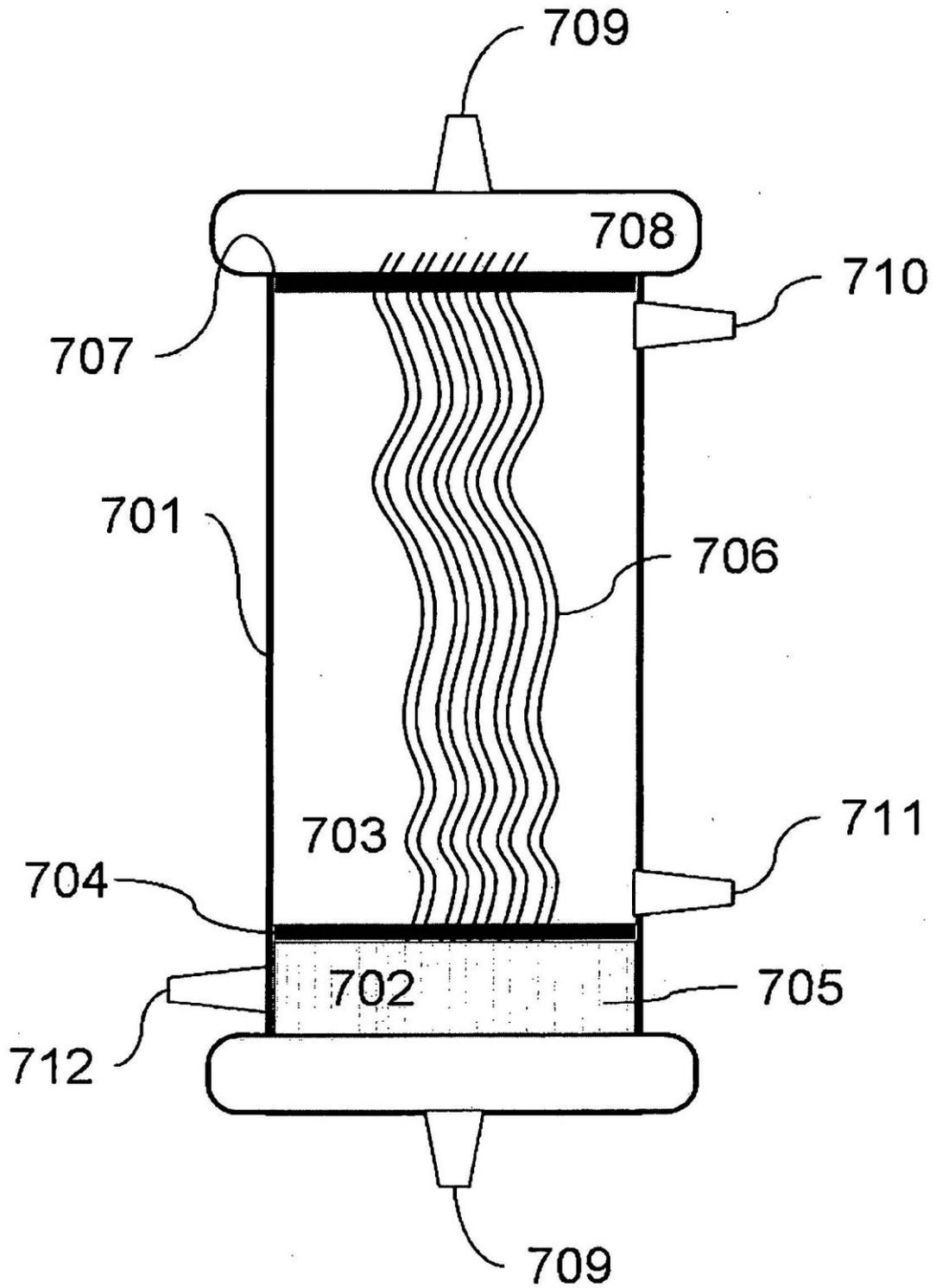


Fig.8

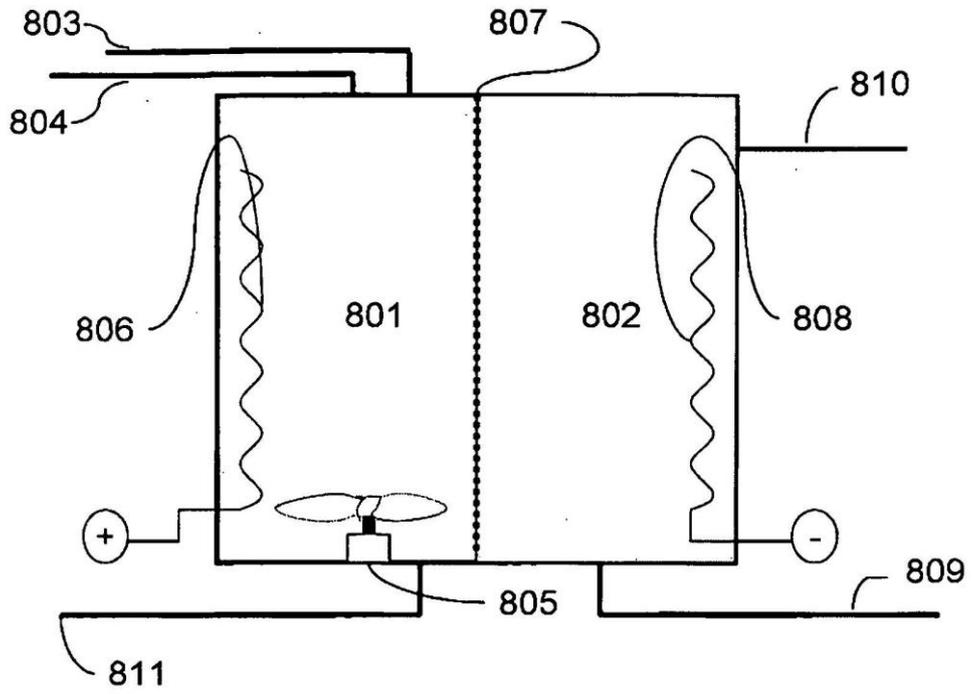


Fig.9

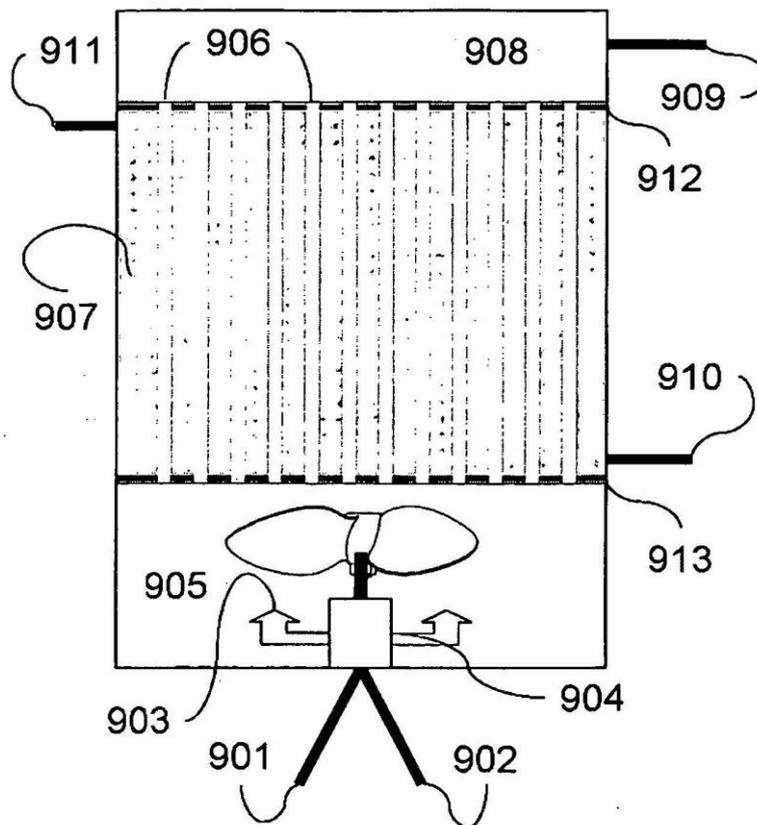


Fig.10

