

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 362**

51 Int. Cl.:

**B01J 20/24** (2006.01)  
**B01J 20/32** (2006.01)  
**B01J 13/04** (2006.01)  
**B01J 13/22** (2006.01)  
**B01J 20/281** (2006.01)  
**B01J 20/285** (2006.01)  
**B01J 20/286** (2006.01)  
**B01J 20/291** (2006.01)  
**B01J 20/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2006 E 06254784 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1764151**

54 Título: **Método y aparato para fabricar perlas de agarosa porosas**

30 Prioridad:

**15.09.2005 US 717371 P**

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

**12.09.2016**

73 Titular/es:

**DPX HOLDINGS B.V. (100.0%)  
Herengracht 483  
1017 BT Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**CHENG, KWOK-SHUN;  
RAMASWAMY, SENTHILKUMAR;  
BIAN, NANYING;  
GAGNON, BRIAN;  
UMANA, JOAQUIN y  
SOICE, NEIL P.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 582 362 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

Método y aparato para fabricar perlas de agarosa porosas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento y aparato para fabricar perlas de agarosa porosas. Más en particular, se refiere a un procedimiento continuo y aparato para fabricar perlas de agarosa porosas que son homogéneas o con núcleo.

## Antecedentes de la invención

10 Las perlas de agarosa son la matriz de base más común para medios de cromatografía. La agarosa es ideal como matriz de base debido a su mínima absorción no específica, hidrofiliidad, fuerte resistencia química a ácido, base y disolventes, alta porosidad y abundancia de grupos OH para reticulación y funcionalización. La mayoría de los medios de lecho empacotado de intercambio iónico y de afinidad se basan en perlas de agarosa. Otro tipo de medios son partículas con un recubrimiento de agarosa en el exterior. Dichas partículas son útiles para fluidizar lecho debido a que la densidad de esas partículas se debe controlar para contrarrestar la resistencia del flujo de fluidización.

15 El método más común para fabricar perlas de agarosa es poniendo en contacto un líquido acuoso y un líquido hidrófobo en un recipiente con agitación. Este procedimiento discontinuo se puede usar para fabricar perlas tanto homogéneas como con núcleo. En el caso de perlas homogéneas, se disuelven sólidos de agarosa en agua calentada a aproximadamente 90°C. La disolución caliente se vierte después en un fluido hidrófobo caliente en un recipiente con agitación. El fluido hidrófobo puede ser un disolvente tal como tolueno o aceite de parafina. Puesto que los dos fluidos no se mezclan, la agitación constante convierte los dos líquidos en una emulsión con la disolución de agarosa como gotitas suspendidas en el fluido hidrófobo. Normalmente, se añade un tensioactivo soluble en el fluido fóbico para estabilizar las gotitas de manera que no se unan en unas más grandes. La emulsión se enfría después para producir que gelifiquen las perlas de agarosa. Los sólidos se lavan después y se tamizan para estrechar la distribución al intervalo útil.

25 La patente de EE.UU. 4.971.833 y la patente de EE.UU. 5.866.006 usan este mismo procedimiento para producir perlas con núcleo. La única diferencia es que se mezclan núcleos con la disolución de agarosa antes de mezclar con el fluido fóbico. La agitación destruye la aglomeración de los núcleos y la disolución de agarosa en unidades más pequeñas. Después de un cierto tiempo de permanencia de aproximadamente 5-10 minutos, se enfría la disolución gradualmente en general en aproximadamente 30 minutos para solidificar la disolución de agarosa en un gel. Después se lavan los sólidos y se tamizan para estrechar la distribución al intervalo útil.

30 Para perlas homogéneas, la limitación del procedimiento discontinuo es el rendimiento. Para que la agarosa forme gotitas, el volumen de la fase fóbica tiene que ser al menos 3 a 1 que de la disolución de agarosa. Por ejemplo, para preparar 500 l de perlas, un recipiente debe contener un total de 2.000 l de disolvente y disolución de agarosa. En operaciones grandes, no es extraño usar reactores con varios miles de galones de capacidad. Lleva mucho más tiempo calentar y enfriar los recipientes grandes como éste. Además, incluso con los ajustes más óptimos, la distribución del tamaño de las perlas es amplio y daría como resultado núcleo único reducido. Además, el mezclamiento en el interior de un recipiente con agitación es inherentemente un procedimiento estadístico. Cada perla sigue su propia ruta y cada una presenta una historia de cizallamiento diferente. Debido a estas faltas de uniformidad, las perlas resultantes pueden presentar propiedades ampliamente diferentes en términos de tamaño y/o espesor de recubrimiento, etc.

40 La mayoría de las patentes describe procedimientos a pequeña escala en los que el procedimiento total, calentamiento y enfriamiento, ocurre en 30 minutos. En escala de producción de masa real, el tiempo del procedimiento podía ser mucho más prolongado. Adicionalmente, como se usa un disolvente inflamable tal como tolueno la mayoría del tiempo, el equipo y las instalaciones a prueba de explosiones pueden resultar muy caros.

45 Hay problemas adicionales usando este procedimiento para producir perlas con núcleo. Las fuerzas de cizallamiento no son uniformes en un recipiente de mezclamiento. En las áreas muertas del recipiente, las fuerzas de cizallamiento no son suficientes para destruir los núcleos, dando como resultado así grandes aglomeraciones de núcleos múltiples. Sin embargo, si la velocidad de agitación es demasiado alta, las fuerzas de cizallamiento cerca del impulsor pueden quitar la disolución de agarosa parcialmente y/o completamente lejos del núcleo. Por esta razón, un recipiente de mezclamiento produce normalmente un bajo rendimiento de perlas del núcleo únicas. Una mayoría de las perlas presenta dos o más núcleos. Mientras pueden ser deseables múltiples núcleos para fluidizar lecho para aumentar su densidad y controlar su movimiento en el lecho, véase la patente de EE.UU. 6.428.707, no es la población preferida para cromatografía de lecho empacotado en la que el control de la ruta de difusión y la rigidez son los objetivos últimos.

55 En vez de un procedimiento discontinuo voluminoso, es deseable usar un procedimiento verdaderamente continuo para fabricar perlas. Aunque el tratamiento de agarosa discontinuo está extensamente investigado y documentado, las patentes y bibliografía no se pronuncian cuando ocurre tratamiento continuo.

Por lo tanto, es muy deseable desarrollar un procedimiento que presente alta producción, alto rendimiento de núcleo

único, sea continuo, no requiera equipo a prueba de explosiones, sea compacto en tamaño y económico para ser construido y operar. Para proporcionar más flexibilidad, también es deseable usar el mismo procedimiento para producir perlas homogéneas o de núcleo. La presente invención proporciona dicho procedimiento.

**Sumario de la invención**

5 Las características esenciales y opcionales de la presente invención se presentan en las reivindicaciones 1 a 6 adjuntas, respectivamente.

Así, según un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para la fabricación de perlas que comprende agarosa, comprendiendo el procedimiento:

- 10 (a) calentar una disolución acuosa de agarosa a una temperatura por encima del punto de gelificación de la agarosa;
- (b) añadir la disolución calentada a un primer líquido hidrófobo que contiene un emulsionante estabilizante de agua en aceite, en el que el líquido se calienta a una temperatura tal que la emulsión resultante está en o por encima de la temperatura de gelificación de la disolución de agarosa y presenta una fase continua que comprende el líquido hidrófobo y una fase discontinua que comprende la disolución de agarosa;
- 15 (c) hacer fluir la emulsión por un mezclador para formar gotitas que comprenden agarosa;
- (d) añadir las gotitas a un segundo líquido hidrófobo enfriado a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa para gelificar las gotitas en perlas y
- (e) recuperar las perlas del segundo líquido,

caracterizado por que el procedimiento es continuo y el mezclador usado en la etapa c) es un mezclador estático.

20 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un aparato para fabricar perlas que comprenden agarosa, estando caracterizado el aparato por que comprende:

- un primer recipiente (4) para disolver agarosa en una disolución acuosa, pudiendo el primer recipiente ser calentado a una temperatura en o por encima de un punto de gelificación de agarosa;
- una entrada al primer recipiente para la introducción de la disolución acuosa;
- 25 un primer baño (8) para contener un líquido hidrófobo y un emulsionante;
- una primera entrada al primer baño para el líquido hidrófobo;
- una segunda entrada al primer baño para la disolución del primer recipiente, estando dicha segunda entrada en comunicación de fluido con el primer recipiente;
- una salida del primer baño en comunicación de fluido con una entrada de un mezclador (12) estático;
- 30 una salida del mezclador estático que está en comunicación de fluido con una entrada de un segundo baño (16) para contener un líquido hidrófobo, pudiéndose mantener el segundo baño a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa y
- una salida del segundo baño,
- pudiéndose usar el aparato de una manera continua.

35 Así, la presente invención se refiere a un método y aparato para formar de manera continua perlas de agarosa o de agarosa con núcleo. El procedimiento implica disolver/gelificar la agarosa en un líquido adecuado, mezclarla con un líquido hidrófobo que contenga un emulsionante del tipo usado para estabilizar las emulsiones de agua en aceite para formar una emulsión y mantener esa emulsión a una temperatura igual a o mayor que la temperatura de gelificación de la agarosa, haciéndola pasar por uno o más mezcladores estáticos para crear gotitas de agarosa y solidificar las gotitas de agarosa en un segundo baño de líquido hidrófobo. Otro método para solidificar las gotitas de agarosa es usar un intercambiador de calor para enfriar la corriente de manera continua después de que salga del mezclador estático. Las perlas se pueden lavar después y usar o tratar más para reticular la agarosa y/o añadir varias funcionalidades sobre la agarosa.

40 Un procedimiento similar se usa para las perlas "con núcleo" excepto que los núcleos, preferiblemente en forma de perla, se introducen en la agarosa antes de que entre en el primer líquido hidrófobo de manera que la agarosa forme un recubrimiento sobre los núcleos.

45 Se puede usar un procedimiento similar con perlas de agarosa (fabricadas por este u otro procedimiento) o agarosa con núcleo (fabricada por este u otro procedimiento) para añadir múltiples capas de agarosa sobre las perlas

existentes.

Un aparato para fabricar las perlas de acuerdo con el procedimiento incluye un tanque de gelificación de agarosa, un primer baño, uno o más mezcladores estáticos y un segundo baño todo preferiblemente en línea y todo preferiblemente en comunicación de fluido entre sí de manera que se cree un procedimiento continuo.

- 5 Una aplicación para las perlas de este procedimiento, especialmente perlas homogéneas es un medio de cromatografía de lecho empaquetado.

Una aplicación para las perlas con núcleo fabricadas por este procedimiento es para un lecho fluidizado o magnetizado.

- 10 Otra aplicación para estas perlas con núcleo es proporcionar rigidez y controlar la ruta de transferencia de masa del medio del lecho empaquetado. Se puede apilar un medio rígido más alto, obteniéndose así mayor capacidad de absorción o de intercambio. Por acortamiento de la ruta de difusión, se puede utilizar el gel a una eficacia mucho mayor que las perlas homogéneas. En ciertas condiciones de operación, las perlas con núcleo pueden dar como resultado picos de elución más agudos y menos consumo de tampón.

- 15 En la etapa c) del procedimiento, la emulsión puede ser bombeada por el mezclador estático para crear gotitas de agarosa.

En la etapa (e) del procedimiento, las perlas de agarosa pueden ser separadas del líquido hidrófobo.

En una realización, el procedimiento se adapta para la fabricación de perlas recubiertas de agarosa, en el que:

la disolución acuosa de agarosa de la etapa a) contiene una pluralidad de núcleos de perla sólidos;

la fase discontinua de la etapa b) comprende la disolución de agarosa y dichos núcleos;

- 20 las gotitas de la etapa c) comprenden agarosa y dichos núcleos;

la etapa d) forma un recubrimiento gelificado de agarosa sobre dichos núcleos y

los núcleos de perlas recubiertas con agarosa se recubren en la etapa e).

El procedimiento puede comprender además las etapas de:

(f) reticular las perlas de agarosa de la etapa (e);

- 25 (g) formar una segunda disolución acuosa de agarosa y calentar la segunda disolución a una temperatura por encima del punto de gelificación de la segunda agarosa;

(h) añadir las perlas de agarosa de la etapa (f) a la segunda disolución;

- 30 (i) añadir las perlas y disolución de la etapa (h) a un tercer líquido hidrófobo, opcionalmente en la forma de un baño, en el que el tercer líquido se calienta a una temperatura de manera que la emulsión resultante esté en o por encima de la temperatura de gelificación de la segunda disolución de agarosa y presente una fase continua que comprenda el tercer líquido hidrófobo y una fase discontinua que comprenda las perlas de agarosa reticuladas y la segunda disolución de agarosa de la etapa (h);

- 35 (j) bombear la emulsión de la etapa (i) por un segundo mezclador estático a un cuarto líquido hidrófobo, opcionalmente en la forma de un baño, enfriado a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa en la segunda disolución para formar un recubrimiento de la segunda disolución de agarosa sobre las perlas de agarosa reticuladas de la etapa (f) y

(k) recuperar las perlas de agarosa reticuladas recubiertas de la etapa (j) del cuarto líquido, opcionalmente por separación.

- 40 Las etapas (f) a (k) pueden ser repetidas para las perlas recubiertas de la etapa (k) una o más veces adicionales, para formar perlas multicapa.

- 45 La presente invención proporciona un aparato para fabricar de manera continua perlas de agarosa que comprende un primer recipiente calentado a una temperatura en o por encima de un punto de gelificación de la agarosa para disolver la agarosa en una disolución acuosa, una entrada al primer recipiente para la introducción de la disolución acuosa, conteniendo un primer baño calentado un líquido hidrófobo y un emulsionante mantenido a una temperatura en o por encima del punto de gelificación de la agarosa, una primera entrada al primer baño para el líquido hidrófobo y una segunda entrada al primer baño para la disolución del primer recipiente, estando una segunda entrada en comunicación de fluido con el primer recipiente, una salida del primer baño en comunicación de fluido con una entrada de un mezclador estático, estando una salida del mezclador estático en comunicación de fluido con una

entrada a un segundo baño, conteniendo el segundo baño un líquido hidrófobo mantenido a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa y una salida del segundo baño.

5 La presente invención también proporciona un aparato para fabricar de manera continua perlas recubiertas de agarosa que comprenden un primer recipiente calentado a una temperatura en o por encima de un punto de gelificación de la agarosa para disolver la agarosa en una disolución acuosa y mezclar la disolución de agarosa disuelta con una pluralidad de núcleos de perla, una entrada al primer recipiente para la introducción de la disolución acuosa, conteniendo un primer baño calentado un líquido hidrófobo y un emulsionante mantenido a una temperatura en o por encima del punto de gelificación de la agarosa, una primera entrada al primer baño para el líquido hidrófobo y una segunda entrada al primer baño para la disolución del primer recipiente, estando dicha segunda entrada en comunicación de fluido con el primer recipiente, una salida del primer baño en comunicación de fluido con una entrada de un mezclador estático, estando una salida del mezclador estático en comunicación de fluido con una entrada a un segundo baño, conteniendo el segundo baño un líquido hidrófobo mantenido a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa, una salida del segundo baño para recuperar las perlas recubiertas.

En los dibujos:

15 La Figura 1A muestra un diagrama de bloques de una realización del procedimiento según la presente invención.

La Figura 1BA muestra un diagrama de bloques de una realización alternativa del procedimiento de la Figura 1A según la presente invención.

20 La Figura 2 muestra un diagrama de bloques de una segunda realización del procedimiento según la presente invención.

La Figura 3 muestra un diagrama de la tercera realización del procedimiento según la presente invención.

La Figura 4 muestra un diagrama de la cuarta realización del procedimiento según la presente invención,

La Figura 5 muestra un diagrama de la quinta realización del procedimiento según la presente invención.

La Figura 6 muestra una partícula formada por una de las realizaciones de la presente invención.

25 La Figura 7 muestra una partícula formada por una de las realizaciones de la presente invención.

La Figura 8 muestra una partícula formada por una de las realizaciones de la presente invención.

La Figura 9 muestra una partícula formada por una de las realizaciones de la presente invención.

La Figura 10 muestra una partícula formada por una de las realizaciones de la presente invención.

### Memoria descriptiva detallada

30 Para minimizar las faltas de uniformidad en la formación de perlas de agarosa y crear un método continuo para fabricar dichas perlas, en vez de un recipiente con agitación, la presente invención utiliza un mezclador estático para formar las perlas. Preferiblemente es un mezclador estático de cizallamiento alto, bajo, de pequeño diámetro. Puesto que un mezclador estático presenta un volumen de retención muy pequeño y es inherentemente continuo, la historia de cizallamiento de las perlas es mucho más uniforme que aquella en un recipiente con agitación. Las áreas muertas son casi inexistentes en un mezclador estático. Como el volumen de retención es muy pequeño, el campo de cizallamiento es muy uniforme. Esta uniformidad permite que un mezclador estático opere a una velocidad de cizallamiento mucho menor cuando se compara con una propuesta de homogeneizador. La velocidad de cizallamiento inferior, uniforme, proporciona mejor control para fabricar perlas con intervalos de tamaño y espesores de recubrimiento fijados y produce mayores porcentajes de perlas con núcleo único.

40 Para generar un cizallamiento suficientemente alto para destruir los aglomerados y controlar el tamaño de partícula de las perlas de agarosa con núcleo y homogéneas, se bombea un alto caudal de desde aproximadamente 50 a aproximadamente 600 l/h a través de un mezclador estático de pequeño orificio, de aproximadamente 0,125 pulg. (3,17 mm) a aproximadamente 1 pulg. (25,4 mm). Alternativamente o además se puede elegir un mezclador con elementos que creen alto cizallamiento a la misma velocidad o menor para crear el cizallamiento deseado necesario para destruir los aglomerados y controlar el tamaño de partícula de las perlas. Los mezcladores estáticos adecuados incluyen, por ejemplo, los mezcladores estáticos Kenics tales como Modelo KMR-SAN-12 un mezclador de 12 elementos, de 0,5 pulg. (12,7 mm) de diámetro y un mezclador estático Ross ISG con un diámetro de 0,5 pulg. (12,7 mm) y 10 elementos. Otros mezcladores estáticos están comercialmente disponibles y serían útiles en la presente invención también.

50 Se forman perlas homogéneas por el procedimiento anterior con variaciones en los intervalos de tamaño que se determinan por el cizallamiento usado, la cantidad de agarosa en disolución y similares.

5 Una combinación de todos los factores anteriores produce partículas con núcleo con recubrimiento sustancialmente uniforme con núcleos únicos como la población predominante. En las condiciones de operación óptimas, el rendimiento de núcleo único puede ser tan alto como 80%. Con un recipiente con agitación convencional de la técnica anterior, el rendimiento optimizado es alrededor de 30%.

10 Un método para fabricar perlas es como sigue y como se muestra en la Figura 1A. Se añade agarosa 2 a un recipiente 4 o tanque con una disolución acuosa y se calienta a una temperatura en o por encima de su punto de gelificación (dependiendo de la agarosa esto es generalmente de aproximadamente 80°C a aproximadamente 120°C) para disolver la agarosa en la disolución acuosa.

15 Aunque el agua es el disolvente preferido para la agarosa, una cantidad minoritaria, se puede añadir hasta 20% en peso de la disolución acuosa, de uno o más co-disolventes para mejorar la solubilidad de la agarosa. Ejemplos de co-disolventes adecuados son dimetilacetamida y/o dimetilsulfóxido. Otros son conocidos para los expertos en la materia.

20 La disolución 6 con la agarosa disuelta se añade después a un primer baño 8 que contiene un fluido hidrófobo y un emulsionante tal como emulsionante Span® 80 de Sigma Chemical, el fluido hidrófobo es preferiblemente un aceite, tal como aceite de parafina, que se calienta en o por encima de la temperatura del punto de gelificación de la agarosa para mantenerla en disolución. Esto forma una emulsión 10 líquida con una fase continua y discontinua en la que el aceite es la fase continua y la disolución de agarosa es la fase discontinua. Preferiblemente, el baño 8 se remueve o agita (no mostrado) para mantener la emulsión 10. La extensión del tiempo en que la disolución y el líquido hidrófobo permanecen en el baño 8 depende de la velocidad a la que se forma la emulsión, la temperatura del baño, la cantidad de agarosa añadida al baño, la cantidad, si hay, de agitación en el baño y otros de tales parámetros. Típicamente, la disolución residiría en el baño sólo durante un periodo de tiempo suficiente para formar la emulsión. Típicamente esto es de aproximadamente 3 minutos a 30 minutos. Preferiblemente, el uso de agitación ayuda a facilitar la formación de la emulsión. Se puede conseguir agitación usando una variedad de mezcladores como es conocido en la técnica. Un medio preferido para crear agitación en un sistema de baños es con un agitador superior tal como un agitador IKA Modelo P4 durante aproximadamente 5 minutos.

30 Se hace fluir después la emulsión 10 o preferiblemente se bombea por un mezclador 12 estático para crear gotitas 14 de disolución de agarosa de tamaño adecuado para las perlas que se desean. Las gotitas 14 salen del mezclador 12 estático a un segundo baño 16 que contiene fluido hidrófobo (preferiblemente sin emulsionante) mantenido a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa. Esto ocasiona que las gotitas de disolución de agarosa gelifiquen y formen estructuras de agarosa autónomas de una forma en general esférica. Preferiblemente, el segundo baño 16 está a una temperatura de desde aproximadamente 1°C a aproximadamente 70°C, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 25°C y lo más preferiblemente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C.

40 Se pueden recuperar después las perlas, tal como por decantación o separación centrífuga y se lavan preferiblemente con agua y se mantienen preferiblemente en un estado húmedo tal como en un baño de agua. Esta etapa de aclarado opcional se realiza en general a temperaturas entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 50°C, preferiblemente entre 20°C y 50°C para retirar cualquier líquido hidrófobo de los baños que pueda llegar a estar concluido de otro modo o atrapado con la estructura de perla porosa. Las perlas se pueden usar después como tales o sometidas a tratamiento adicional tal como reticulación y/o funcionalización.

45 Opcionalmente, las perlas pueden ser sometidas después de reticulación a un segundo pase por el procedimiento para crear otra capa de agarosa en la parte superior de la perla. También se pueden realizar pases adicionales por el procedimiento después de eso. La agarosa puede ser la misma o diferente (por ejemplo en % de agarosa, por ejemplo, disolución de agarosa al 3% frente a disolución al 6% o 4%; en aditivos; etc).

50 Como se mencionó anteriormente en el Resumen de la Invención una realización alternativa a la de la Figura 1A (mostrado en la Figura 1B) presenta el segundo baño 16 de fluido reemplazado por un intercambiador 17 de calor que enfría el primer fluido hidrófobo que contiene las gotitas a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa produciendo que gelifiquen y formen estructuras de agarosa autónomas. El intercambiador 17 de calor puede tener una longitud y presentar una capacidad para reducir la temperatura de la agarosa que sale del mezclador estático de una manera controlada. Puede ser capaz de una temperatura o si se desea puede ser subdividida o formada de varios intercambiadores de calor en una fila de manera que se suministre un gradiente de temperaturas al líquido. En general, el intercambiador de calor debería estar a una temperatura de desde aproximadamente 1°C a aproximadamente 70°C, más preferiblemente de aproximadamente 1 a 50°C y lo más preferiblemente de aproximadamente 15°C a aproximadamente 45°C.

También como se discute en el Sumario de la Invención anterior, el tanque 4 de fusión de agarosa y/o el primer baño 8 se pueden reemplazar por intercambiadores de calor además de o en lugar del segundo baño, si se desea (no

mostrado).

Un procedimiento similar mostrado en la Figura 2 puede ser usado para crear perlas de núcleo que presentan un núcleo 3 central de un material y una o más capas de agarosa recubiertas en la parte superior del núcleo. Los núcleos 3 se introducen en el procedimiento en la primera etapa (el recipiente 4) y se recubren con la agarosa 2 durante el procedimiento.

Por último, se puede diseñar el sistema de manera que uno o ambos baños así como el recipiente de la disolución se reemplacen con dispositivos intercambiadores de calor.

En otra realización mostrada en la Figura 3, la agarosa 2 se disuelve en un recipiente 4 calentado como se explicó anteriormente, preferiblemente con alguna agitación como se muestra por el agitador 5 mientras el fluido 9 hidrófobo se calienta por separado en un intercambiador 11 de calor. El contenido del recipiente 4 y el intercambiador 11 de calor se bombean a través de las bombas 13A y B a una entrada 15 de un mezclador 12 estático para formar la emulsión así como crear las gotitas de agarosa. Las gotitas fluyen después a un baño 16 que contiene un líquido hidrófobo enfriado a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa para producir que las gotitas gelifiquen. Las perlas se pueden separar después de manera que en un separador 17 de aceite/perla/agua y, como opcionalmente, se pueden tamizar o fraccionar después las perlas en diferentes tamaños mediante un fraccionador o tamiz 19. Las perlas homogéneas y las perlas de núcleo de la presente invención pueden ser fabricadas por el mismo procedimiento y equipo, siendo la única diferencia que los núcleos se añaden también al recipiente 4 en la Figura 3 cuando se usan.

La Figura 4 muestra otro método y dispositivo para fabricar perlas de acuerdo con la presente invención. En esta realización, todo los recipientes y baños se reemplazan con mezcladores, intercambiadores de calor y/o mezcladores estáticos. La agarosa 20, opcionalmente los núcleos 21 si se usan, y disolución 22 acuosa se añaden a un mezclador 24 calentado. Opcionalmente, la disolución acuosa se puede precalentar para acelerar la gelificación de la agarosa. El líquido hidrófobo que contiene un emulsionante 26 se calienta en un primer intercambiador 28 de calor y el líquido 26 hidrófobo y la disolución de agarosa del mezclador 24 se mezclan en un primer mezclador 30 estático para formar la agarosa o gotitas de agarosa/núcleo. El segundo líquido 31 hidrófobo se suministra a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa como se muestra (por ejemplo, a temperatura ambiente o 20°C) o se puede enfriar en un segundo intercambiador de calor (no mostrado) y el segundo líquido y la salida del primer mezclador 30 estático fluyen por un segundo mezclador 34 estático para producir que gelifiquen las gotitas. El fluido del segundo mezclador estático puede ser separado después opcionalmente en este caso usando una centrifuga 36 con las perlas que van a un tamiz 38 y el resto del material (disolución acuosa, líquidos hidrófobos, etc.) que van a desecho o un sistema 40 de reciclado.

La Figura 5 muestra un método y dispositivo más para fabricar perlas de acuerdo con la presente invención. En esta realización, el método y sistema es sustancialmente idéntico al de la Figura 4 excepto que el mezclador 24 de laboratorio es reemplazado por un intercambiador 25 de calor que calienta la agarosa, disolución acuosa y opcionalmente los núcleos si se usan.

Como se muestra en la Figura 6, las perlas homogéneas son bastante regulares. Como se muestra en la Figura 7 el recubrimiento de agarosa de los núcleos de poliestireno como se fabrican por el Ejemplo 2 a continuación es muy uniforme. De hecho, con núcleos de poliestireno monodispersados, las partículas de gel con núcleo único están dentro del 5% de desviación, que es probablemente el medio de gelificación más uniforme indicado nunca. La Figura 8, muestra el recubrimiento de agarosa sobre núcleos resistentes a álcali del Ejemplo 3 a continuación. La Figura 9 muestra perlas recubiertas de agarosa de núcleo de agarosa fabricadas de acuerdo con el Ejemplo 4. La Figura 10 muestra perlas multicapa de acuerdo con el Ejemplo 5.

Puesto que la velocidad de bombeo es alta, la producción del procedimiento es prácticamente ilimitada. Cada mezclador estático puede producir hasta 150 l/h de perlas. Puesto que el tamaño de este mezclador no es generalmente mayor que un lápiz, conectando una serie de estos mezcladores en paralelo se pueden producir en masa perlas muy uniformes económicamente. Para generar las perlas, no lleva más de una o más bombas y una serie de mezcladores estáticos económicos. Con esta tecnología, es posible crear un sistema de producción de perlas continuo verdadero como se ilustra en las Figuras. Otra ventaja de este sistema es que el mismo sistema se puede usar para fabricar perlas recubiertas o perlas homogéneas. Sin embargo, con perlas homogéneas, la distribución de tamaño será más amplia cuando esté ausente el núcleo para controlar el tamaño final de la perla.

Se puede usar cualquier agarosa en la presente invención. Una agarosa adecuada es D-5 de Hispanagar. La agarosa se usa en general en una concentración de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 25% en peso de la disolución acuosa.

Los núcleos de la agarosa recubierta de la presente invención se pueden fabricar de cualquier material que sea útil en cromatografía. Por ejemplo, el núcleo puede ser una perla de agarosa reticulada (fabricada por el presente procedimiento o cualquier otro procedimiento), un plástico, metal, vidrio o cerámica. Preferiblemente, cuando la perla acabada tiene que presentar alta rigidez, el núcleo se selecciona de un material que no funda a las temperaturas usadas en el presente procedimiento y que sea autónomo. Los materiales adecuados incluyen, pero no se limitan a,

plásticos tales como poliestireno, polietileno, polipropileno, mezclas de polietileno y polipropileno, perlas de polietileno/polipropileno multicapa, acrílicos, polisulfonas, polietersulfonas, PVDF o PTFE; vidrio tal como vidrio de borosilicato, vidrio resistente a álcalis y vidrio de poro controlado, metales tales como acero inoxidable, níquel, titanio, paladio y cobalto o varias aleaciones y mezclas de hierro, metales que contienen hierro u otros metales magnetizados y materiales cerámicos, tales como materiales de silicato, circonia y diversas mezclas cerámicas.

Los núcleos son preferiblemente de una forma de material en forma de partículas en general esférica o irregular. Su diámetro depende del tamaño de la perla que uno desee pero preferiblemente son de aproximadamente 30 micrómetros a aproximadamente 150 micrómetros de diámetro.

Como es común en la fabricación de perlas de agarosa, se pueden usar varios aditivos para mejorar la producción o añadir una propiedad a las perlas.

Una clase de aditivos comprende compuestos orgánicos volátiles, miscibles con la disolución. Son ejemplos alcoholes monohídricos tales como metanol, etanol y propanoles. Estos se pueden usar hasta concentraciones que proporcionen una disolución ligeramente turbia. Cantidades mayores de estos alcoholes pueden producir la precipitación de la agarosa. También se pueden usar cetonas miscibles tales como acetona, pero se debe tener cuidado ya que la solubilidad de la agarosa es menor en mezclas de cetona-agua. Cualquier mezcla de dos o más de estos materiales también se contempla.

Una clase más de aditivos comprende compuestos orgánicos miscibles no volátiles. Ejemplos no limitantes de éstos incluyen: glicerina, etilenglicol, metilpentanodiol, dietilenglicol, propilenglicol, trietilenglicol, los metil, etil o n-butil éteres de etilenglicol, los dimetil o dietil éteres de etilenglicol, acetato de etilenglicol dimetil éter, acetato de etilenglicol dietil éter, dietilenglicol metil éter, dietilenglicol etil éter, dietilenglicol n-butil éter, dietilenglicol dimetil éter, dietilenglicol dietil éter, acetato de dietilenglicol dimetil éter, acetato de dietilenglicol dietil éter, N-metilmorfolina, N-etilmorfolina y similares. También son ejemplos de materiales que están en esta clase los polietilenglicoles de bajo peso molecular. Cualquier mezcla de dos o más de estos materiales también se considera.

Otra clase de aditivos comprende polímeros solubles en agua, que incluyen como ejemplos, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polietilenglicoles, dextranos y poliacilamidas solubles en agua, incluyendo poliacilamidas solubles en agua, incluyendo poliacilamidas sustituidas, tales como polidimetilacrilamida. Estos aditivos poliméricos se pueden usar como mezclas con la agarosa en la etapa de disolución inicial o se pueden disolver en la disolución después de la adición y disolución de la agarosa. Se debe tener cuidado para no añadir una cantidad excesiva de polímero, ya que puede tener lugar la coagulación de la disolución. Las relaciones de polímero a agarosa de desde aproximadamente 0,1 a 10 son posibles. Los polímeros preferidos son alcohol polivinílico, dextranos y poliacrilamidas.

Adicionalmente, se pueden añadir a la disolución uno o más emulsionantes o tensioactivos. Cada combinación de tipo de disolución requerirá alguna experimentación para determinar el tipo y cantidad óptimos de emulsionante o tensioactivo. Estos se pueden usar en concentraciones de desde aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% por peso total de la disolución. El emulsionante se añade al aceite y no es soluble en agua.

La agarosa puede ser reticulada después si se desea por cualquiera de las químicas comúnmente usadas en la industria para reticular materiales que contienen grupos hidroxilo múltiples, tales como perlas de polisacáridos, siendo estas químicas como ejemplos no limitantes, epiclorohidrina u otros compuestos epoxídicos multifuncionales, diversas químicas de bromilo u otros haluros multifuncionales; formaldehído, gluteraldehído y otros aldehídos multifuncionales, bis(2-hidroxietyl)sulfona, dimetilclorosilano, dimetilolurea, dimetiloletilenourea, diisocianatos o poliisocianatos y similares.

Puede presentar también una o más funcionalidades aplicadas a la misma, incluyendo ligandos, tales como Proteína A o Proteína G, versiones naturales o derivadas de manera recombinante de, versiones modificadas de la proteína A o G para hacerlas más estables a cáusticos y similares, diversos ligandos químicos tales como 2-aminobenzimidazol (ABI), aminometilbenzimidazol (AMBI), mercaptoetilpiridina (MEP) o mercaptobenzimidazol (MBI) o diversas químicas para hacer la agarosa catiónica, aniónica, fílica, fóbica o cargada, como es conocido en la técnica de la formación de medios.

Los grupos funcionales usados en cromatografía líquida que son adecuados para la presente invención incluyen grupos tales como, pero no limitándose a, intercambio iónico, bioafinidad, hidrófobos, grupos útiles para cromatografía covalente, grupos de interacción tiofílica, quelato o quelante, grupos que tienen las denominadas interacciones pi-pi con compuestos fijados como objetivo, enlace de hidrógeno, hidrófilos, etc.

Estos grupos se pueden añadir después de que se ha formado y reticulado la perla de agarosa o se pueden añadir a la disolución inicial y se modifica la composición de la disolución inicial de acuerdo con eso, tal como siendo el pH reducido o aumentado, de manera que tenga lugar la reacción para unir los grupos funcionales a la agarosa de manera concurrente con la reacción de reticulación.

Una aplicación de las perlas de agarosa homogéneas es para uso en cromatografía líquida de lecho empacado.

Un ejemplo es la cromatografía de filtración de gel donde los constituyentes de la muestra se separan basándose en su tamaño. Otro ejemplo es la cromatografía de intercambio iónico donde los grupos cargados se unen a la matriz de agarosa y se efectúa la separación de los constituyentes en las muestras por interacciones y iónicas. Otro ejemplo de la aplicación de perlas de agarosa homogéneas es la cromatografía de afinidad. Los ligandos de afinidad pueden estar unidos mediante enlaces covalentes al medio de agarosa y ofrecen una ruta de separación altamente selectiva para los constituyentes de la muestra.

Una aplicación para las perlas de núcleo es proporcionar rigidez y controlar la ruta de transferencia de masa del medio de lecho empacado. Un medio rígido puede ser apilado más alto, consiguiéndose así mayor capacidad de absorción o de intercambio. Por acortamiento de la ruta de difusión, el gel puede ser utilizado a una eficacia mucho mayor que las perlas homogéneas. En ciertas condiciones de operación, las perlas de núcleo pueden dar como resultado picos de elución más agudos y menos consumo de tampón.

Otra aplicación de las perlas de núcleo es en cromatografía de lecho fluidizado o cromatografía magnética donde el núcleo proporciona la densidad requerida (para lechos fluidizados) o las propiedades magnéticas para la cromatografía magnetizada.

Ejemplo 1- Perla homogénea.

Se añaden 1.000 ml de disolución de agarosa al 6% (Agarosa D-5 de Hispanagar) a 2.000 ml de aceite de parafina que contenía 120 ml de emulsionante Span 80 en un primer baño de aceite a 80°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Después se bombeó la emulsión por un mezclador estático Kenics de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo (KMR-SAN-12) a un caudal de 3 l/min a un segundo baño de aceite de parafina a 5°C. Se obtuvieron perlas de agarosa homogéneas esféricas con un diámetro de partícula más grande de 200 um.

Ejemplo 2 – Perla de núcleo de poliestireno.

Se mezclaron 300 ml de esferas de poliestireno monodimensionadas, de 80 um de diámetro (Dynoseeds TS-80-13 de Microbeads) con 900 ml de disolución de agarosa al 4% (D-5 Agarosa de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla agarosa-núcleo a 2.000 ml de aceite de parafina a 80°C que contenía 120 ml de emulsionante Span™ 80 con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Después se bombeó la emulsión por un mezclador estático Kenics de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo (KMR-SAN-12) a un caudal de 9 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de núcleo resultantes presentaron un espesor de recubrimiento estimado de 10 um y la población de perlas fue predominantemente (>50% en volumen) de núcleo único.

Ejemplo 3 – Perla de núcleo de vidrio resistente a álcalis.

Se mezclaron 200 ml de esferas de vidrio resistentes a álcalis de diámetro promedio 100 um (Mo-Sci Corporation) con 200 ml de disolución de agarosa al 6% (D-5 Agarosa de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla agarosa-núcleo a 2.000 ml de aceite de parafina que contenían 120 ml de Span a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Se bombeó después la emulsión por un mezclador estático Ross ISG de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de núcleo resultantes presentaron un espesor de recubrimiento estimado de 10 um y la población de perlas fue predominantemente de núcleo único (>50%).

Ejemplo 4 – Perla de núcleo de agarosa.

Se añadieron 900 ml de disolución de agarosa al 15% (D-5 Agarosa de Hispanagar) a 2.000 ml de aceite de parafina que contenía 120 ml de emulsionante Span™ 80 en un primer baño de aceite a 80°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Se bombeó después la emulsión por un mezclador estático Kenics de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo (KMR-SAN-12) a un caudal de 3 l/min a un segundo baño de aceite de parafina a 5°C. Se obtuvieron perlas de agarosa homogéneas esféricas con el diámetro de partícula más grande de 200 um. Se reticularon después las perlas usando epíclorohidrina por el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. 4.971.833 mencionada anteriormente. Se mezclaron 75 ml de esferas (núcleos) de agarosa reticuladas al 15% de 100 um de diámetro promedio con 100 ml de disolución de agarosa al 4% (D-5 Agarosa de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla agarosa-núcleo a 2.000 ml de aceite de parafina que contenía 40 ml de Span 80 a 80°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Se bombeó después la emulsión por un mezclador estático Ross ISG de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de núcleo resultantes presentaron un espesor de recubrimiento estimado de 10 um y la población de perlas fue predominantemente de núcleo único (>50%).

Ejemplo 5 – Perla con recubrimientos múltiples.

Se mezclaron 300 ml de esferas de vidrio de borosilicato de 63-75 um de diámetro (Mo-Sci Corporation, GL0179) con 900 ml de disolución de agarosa al 6% (D-5 Agarosa de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la

mezcla agarosa-núcleo a 2.000 ml de aceite de parafina que contenía 120 ml de emulsionante Span™ 80 a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Se bombeó después la emulsión por un mezclador estático Ross ISG de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo a un caudal de 9 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de núcleo resultante presentaron un espesor de recubrimiento de agarosa estimado de 10 µm y la población de perlas fue predominantemente de núcleo único (>50% en volumen). Se reticuló el recubrimiento de agarosa de acuerdo con la patente de EE.UU. 4.971.833 y se funcionalizó para fines de intercambio aniónico. Se mezclaron después 25 ml de las perlas en 150 ml de disolución de agarosa al 3% (D-5 Agarosa de Hispanagar) para obtener una suspensión. Se añadió la mezcla de perlas de agarosa a 1.000 ml de aceite de parafina a 90°C con agitación constante para obtener una emulsión en la que la fase oleosa era continua. Se bombeó después la emulsión por un mezclador estático Kenics de 0,5 pulg., (12,7 mm) de diámetro, 6 pulgadas (152,4 mm) de largo (KMR-SAN-12) a un caudal de 3 l/min en aceite de parafina a 5°C. Las perlas de núcleo doblemente recubiertas resultantes presentaron un segundo espesor de recubrimiento estimado de 10 µm y la población de perlas fue predominantemente de núcleo único (>50%).

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la fabricación de perlas de agarosa que comprende:

(a) calentar una disolución acuosa de agarosa a una temperatura por encima del punto de gelificación de la agarosa;

5 (b) añadir la disolución calentada a un primer líquido hidrófobo que contiene un emulsionante estabilizante de agua en aceite, en la que el líquido se calienta a una temperatura tal que la emulsión resultante está en o por encima de la temperatura de gelificación de la disolución de agarosa y presenta una fase continua y una discontinua en la que el líquido hidrófobo es la fase continua y la disolución de agarosa es la fase discontinua;

10 (c) hacer fluir la emulsión por un mezclador para formar gotitas de agarosa;

(d) añadir las gotitas a un segundo líquido hidrófobo enfriado a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa para gelificar las gotitas de agarosa en perlas y

(e) recuperar las perlas de agarosa del segundo líquido,

**caracterizado por que** el procedimiento es continuo y el mezclador usado en la etapa (c) es un mezclador estático.

15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que:

i) el primer líquido está a una temperatura de desde 80°C a 120°C y el segundo líquido está a una temperatura de 1°C a 70°C o

ii) en el que la emulsión de la etapa (d) fluye por el mezclador estático a una velocidad de 1 a 10 l/minuto o

iii) en el que el flujo por el mezclador estático es de 50 l/h a 600 l/h o

20 iv) en el que la agarosa está en una concentración de desde 1 a 25% en peso en la disolución acuosa o

v) que comprende además aplicar agitación al primer líquido o

vi) que comprende además lavar las perlas de agarosa de la etapa (d) o

vii) que comprende además reticular las perlas de agarosa de la etapa (d) o

25 viii) que comprende además lavar las perlas de agarosa de la etapa (d) con agua y reticular después las perlas.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:

(f) reticular las perlas de agarosa de la etapa (e);

(g) formar una segunda disolución acuosa de agarosa y calentar la segunda disolución a una temperatura por encima del punto de gelificación de la segunda agarosa;

30 (h) añadir las perlas de agarosa de la etapa (f) a la segunda disolución;

(i) añadir las perlas y disolución de la etapa (h) a un tercer líquido hidrófobo que contiene un emulsionante en la que el tercer líquido se calienta a una temperatura tal que la emulsión resultante está en o por encima de la temperatura de gelificación de la segunda disolución de agarosa y presenta una fase continua y discontinua en la que el tercer líquido hidrófobo es la fase continua y las perlas y la segunda disolución de agarosa de la etapa (h) son la fase discontinua;

35 (j) bombear la emulsión de la etapa (i) por un segundo mezclador estático a un cuarto líquido hidrófobo enfriado a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa en la segunda disolución para formar un recubrimiento de la segunda disolución de agarosa sobre las perlas de agarosa de la etapa (f) y

40 (k) recuperar las perlas de agarosa recubiertas de la etapa (j) del líquido del cuarto líquido y opcionalmente

(l) repetir las etapas (f) a (k) para las perlas recubiertas de la etapa (k) una o más veces adicionales.

4. Un procedimiento para la fabricación de perlas de agarosa recubiertas que comprende:

(a) calentar una disolución acuosa de agarosa que contiene una pluralidad de perlas sólidas a una temperatura por encima del punto de gelificación de la agarosa;

- (b) añadir la disolución calentada de la etapa (a) a un primer líquido hidrófobo y un emulsionante estabilizante de agua en aceite calentado a una temperatura en o por encima de la de la disolución de la etapa (a) para formar una emulsión que tiene una fase continua y discontinua en la que el líquido hidrófobo y emulsionante son la fase continua y la disolución de agarosa y las perlas sólidas son la fase discontinua;
- 5 (c) hacer fluir la emulsión de la etapa (b) por un mezclador estático para crear gotitas de agarosa y perlas sólidas;
- (d) hacer fluir las gotitas de la etapa (c) a un segundo líquido hidrófobo enfriado a una temperatura por debajo de la del punto de gelificación de la agarosa para formar un recubrimiento gelificado sobre las perlas sólidas y
- 10 (e) recuperar las perlas recubiertas de la etapa (d) del líquido del segundo baño, **caracterizado por que el procedimiento es continuo y el mezclador usado en la etapa (d) es un mezclador estático.**
5. Un aparato para fabricar perlas que comprende agarosa, estando caracterizado el aparato por que comprende:
- un primer recipiente (4) para disolver agarosa en una disolución acuosa, pudiendo ser calentado el primer recipiente a una temperatura en o por encima de un punto de gelificación de agarosa;
- 15 una entrada al primer recipiente para la introducción de la disolución acuosa;
- un primer baño (8) para contener un líquido hidrófobo y un emulsionante;
- una primera entrada al primer baño para el líquido hidrófobo;
- una segunda entrada al primer baño para la disolución del primer recipiente, estando dicha segunda entrada en comunicación de fluido con el primer recipiente;
- 20 una salida del primer baño en comunicación de fluido con una entrada de un mezclador (12) estático;
- una salida del mezclador estático que está en comunicación de fluido con una entrada de un segundo baño (16) para contener un líquido hidrófobo, pudiéndose mantener el segundo baño a una temperatura por debajo del punto de gelificación de la agarosa y
- una salida del segundo baño,
- 25 pudiéndose usar el aparato de una manera continua.
6. El aparato según la reivindicación 5, para fabricar perlas recubiertas de agarosa, en el que el primer recipiente (4) incluye medios para mezclar la disolución de agarosa disuelta con una pluralidad de núcleos de perla.

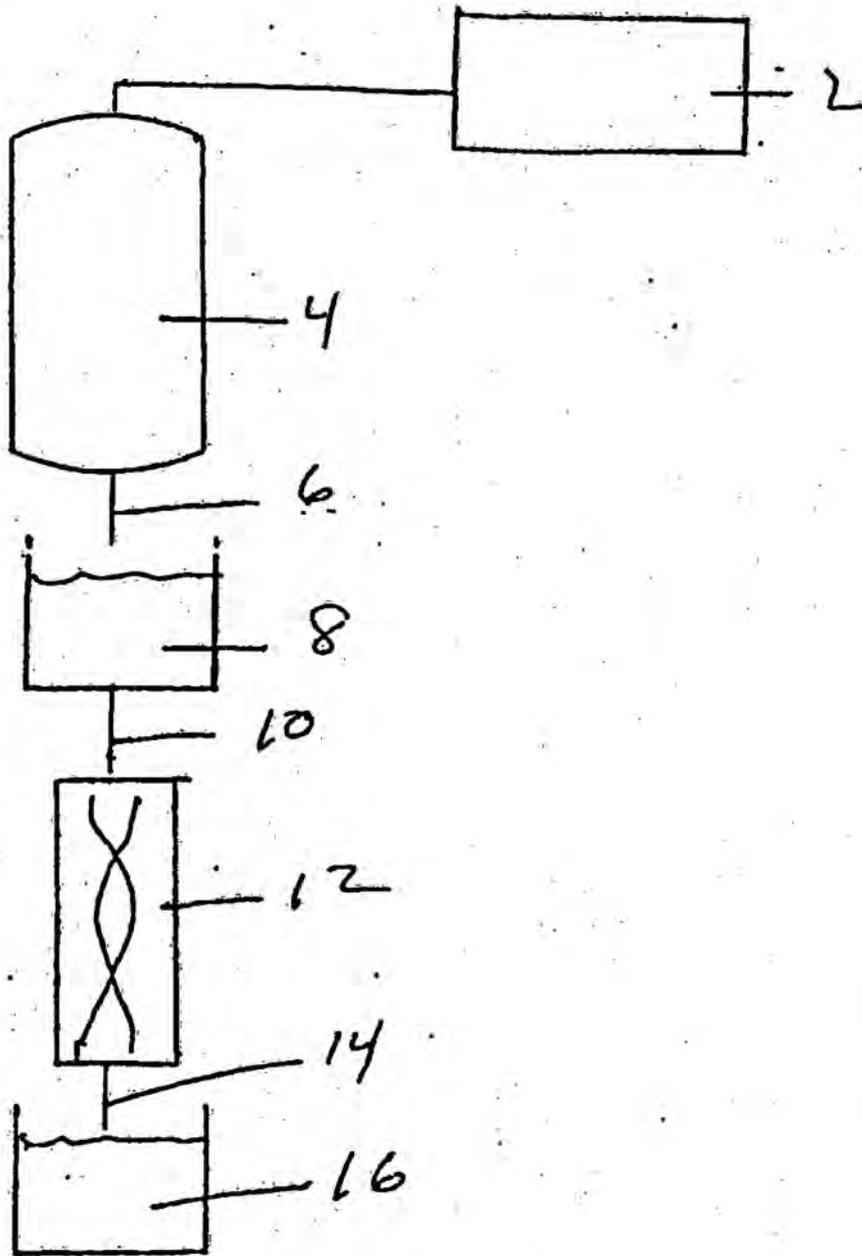


Figura 1A

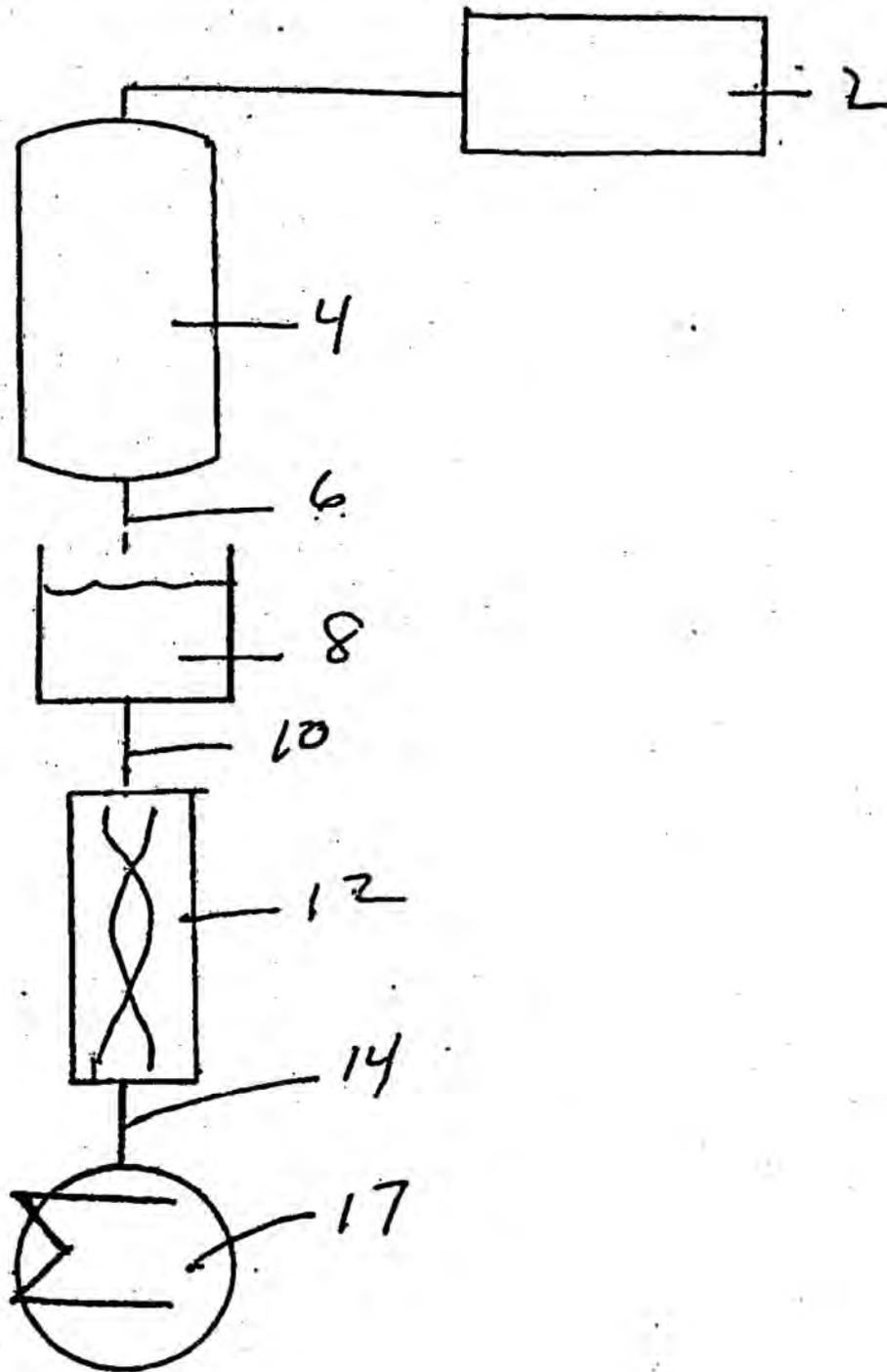


Figura 1B

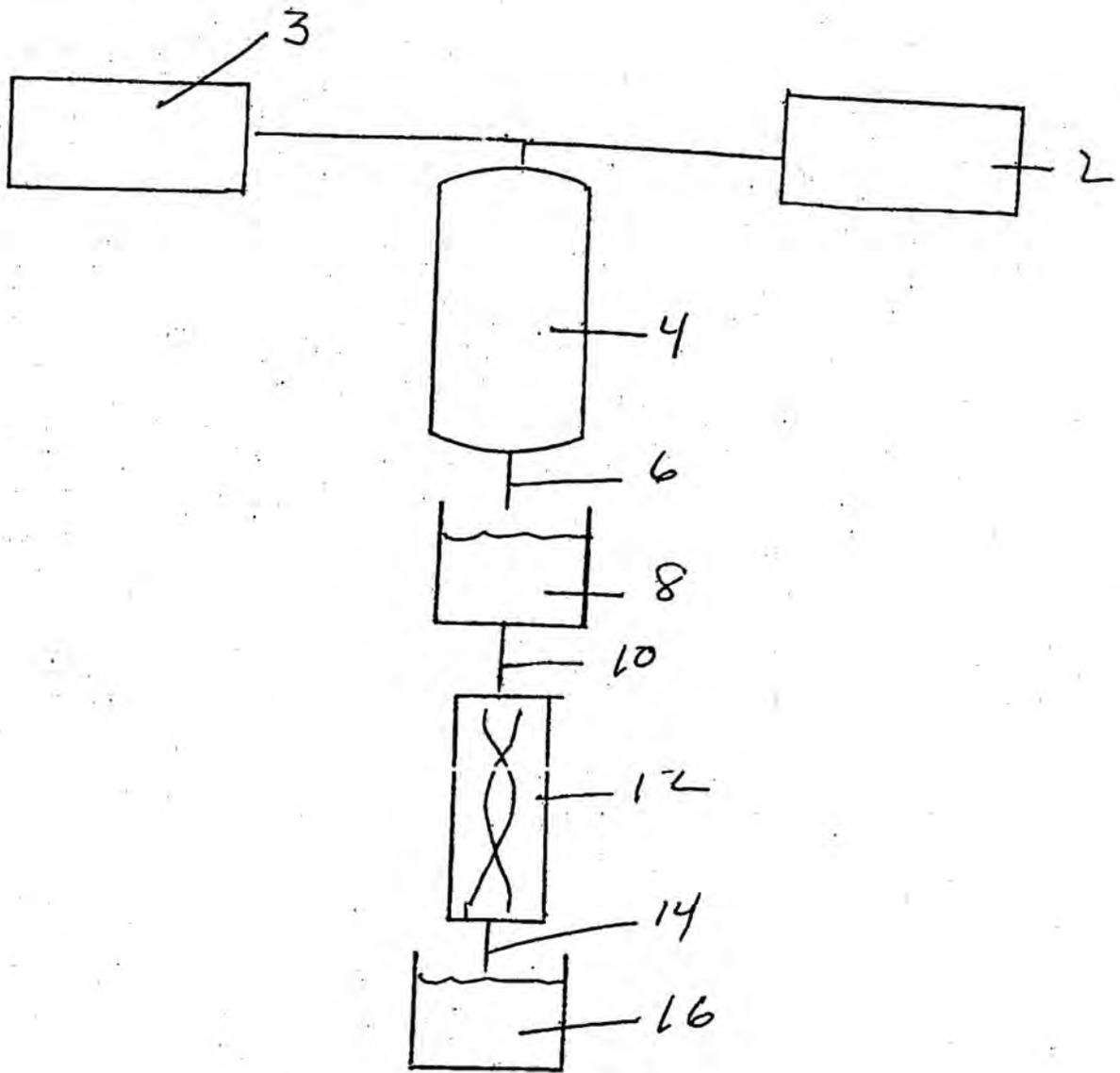


Figura 2

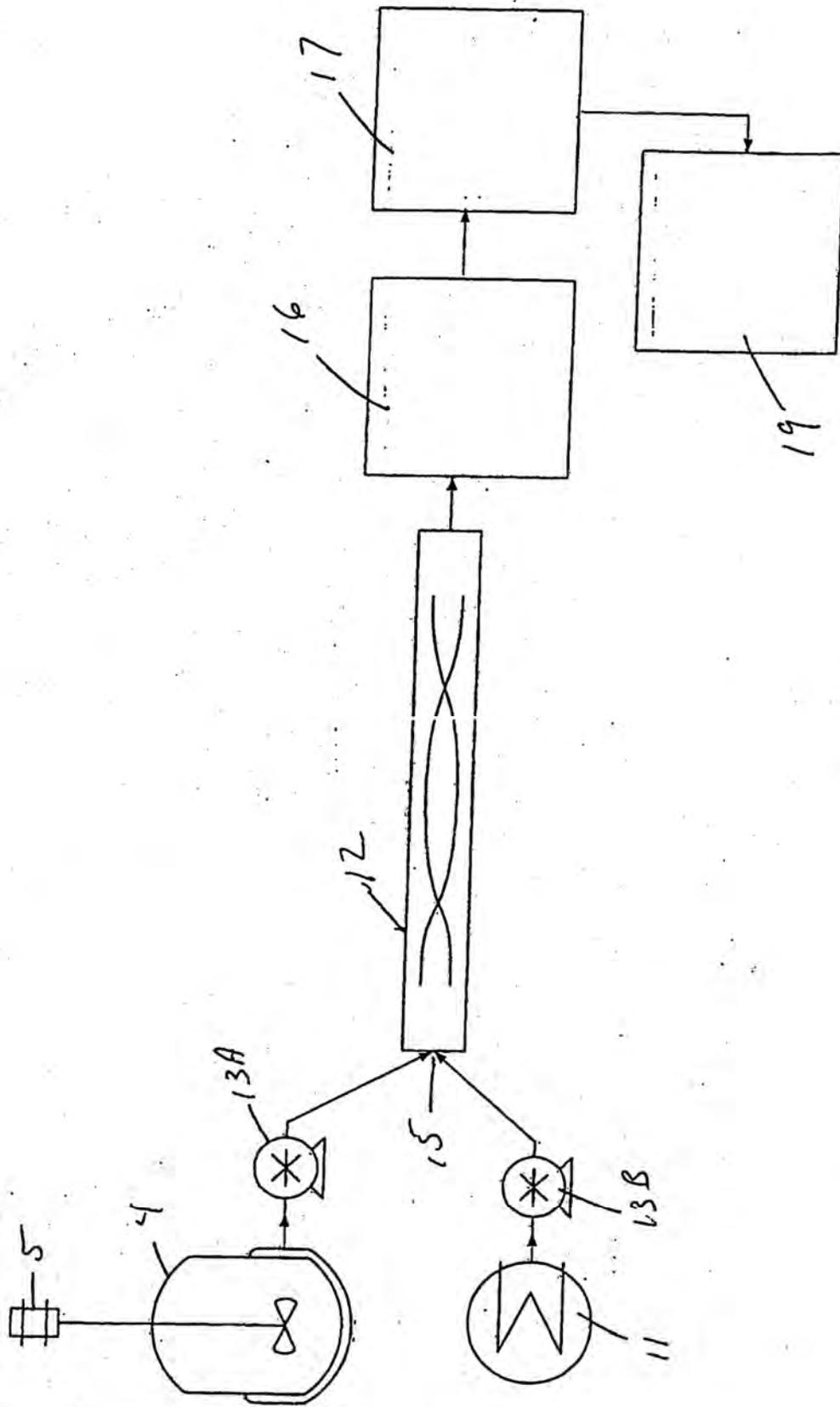


Figura 3

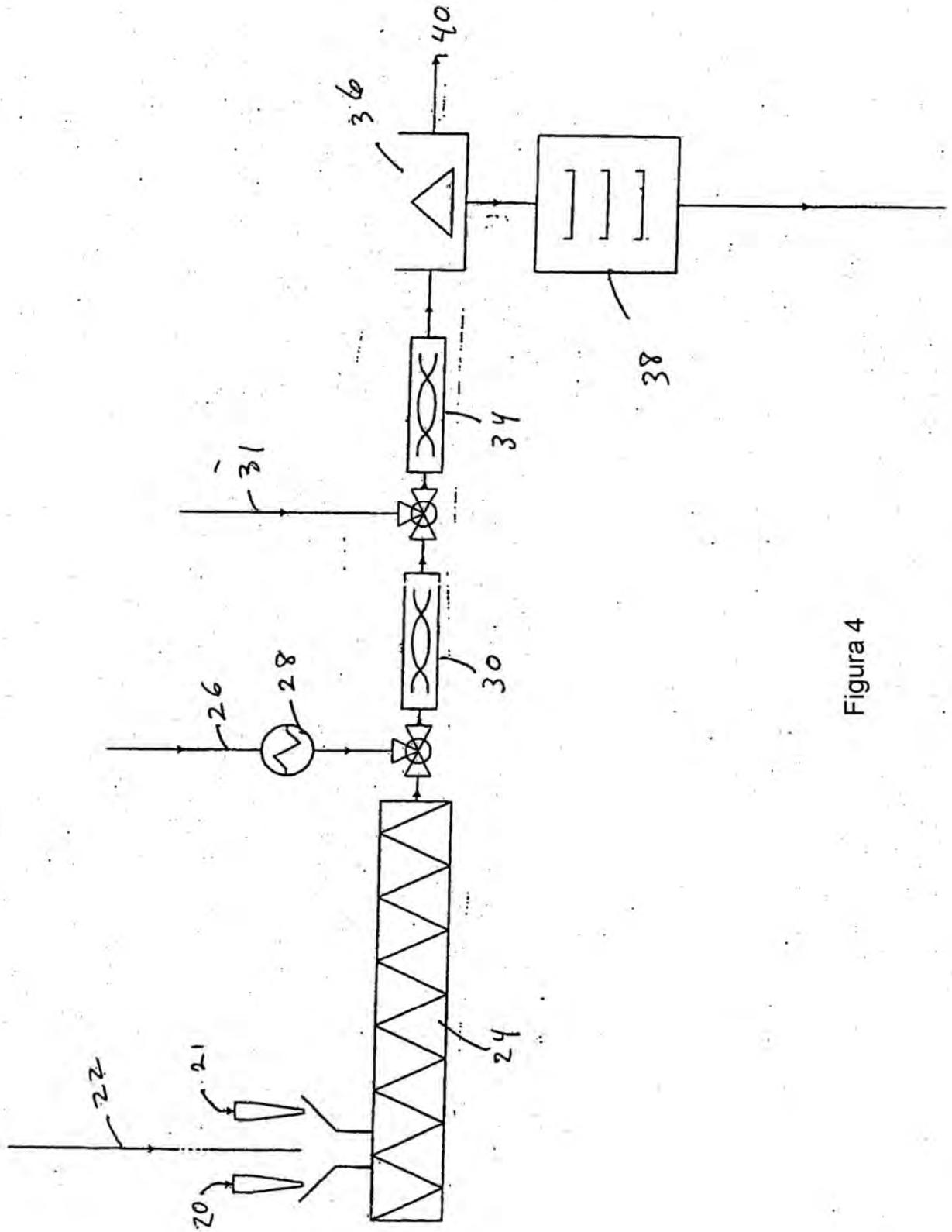


Figura 4

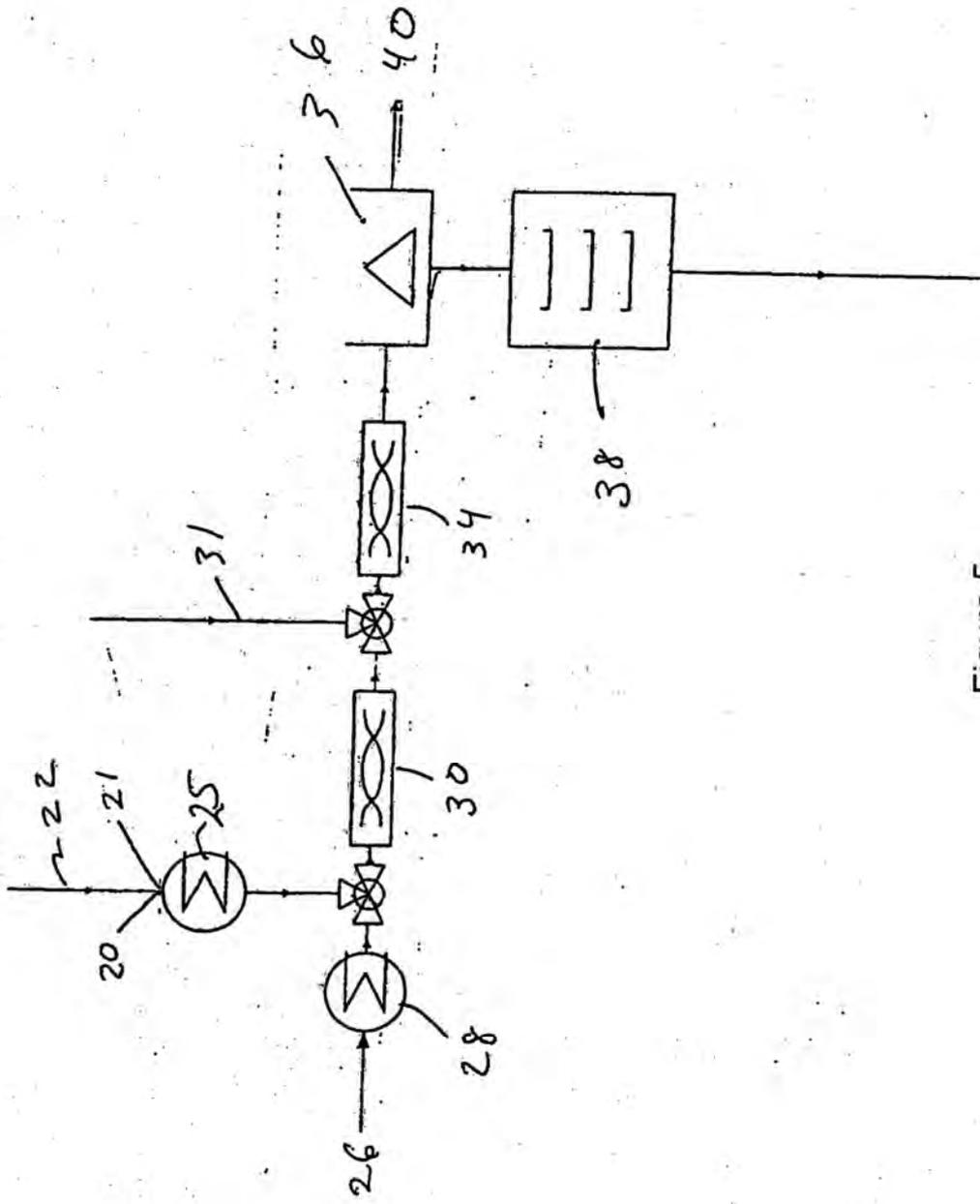


Figura 5

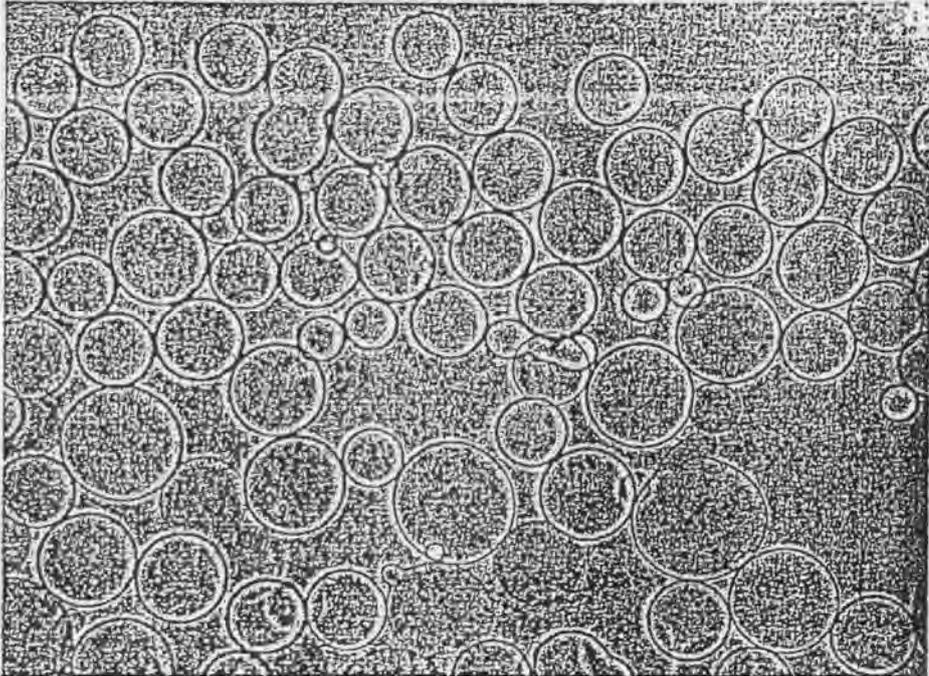


Figura 6

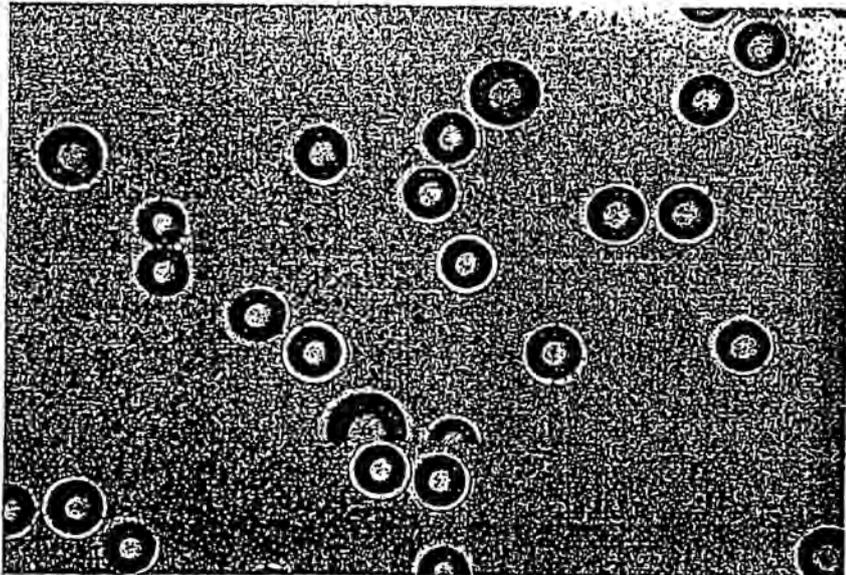


Figura 7

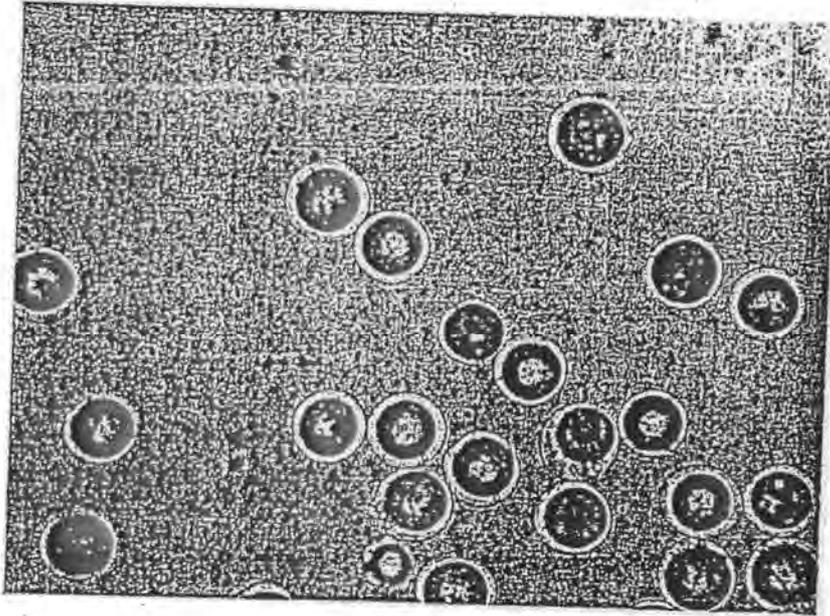


Figura 8

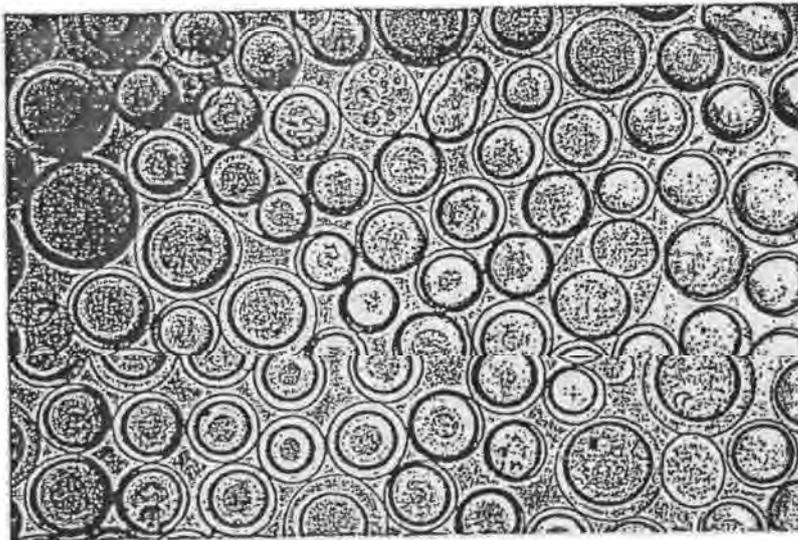


Figura 9

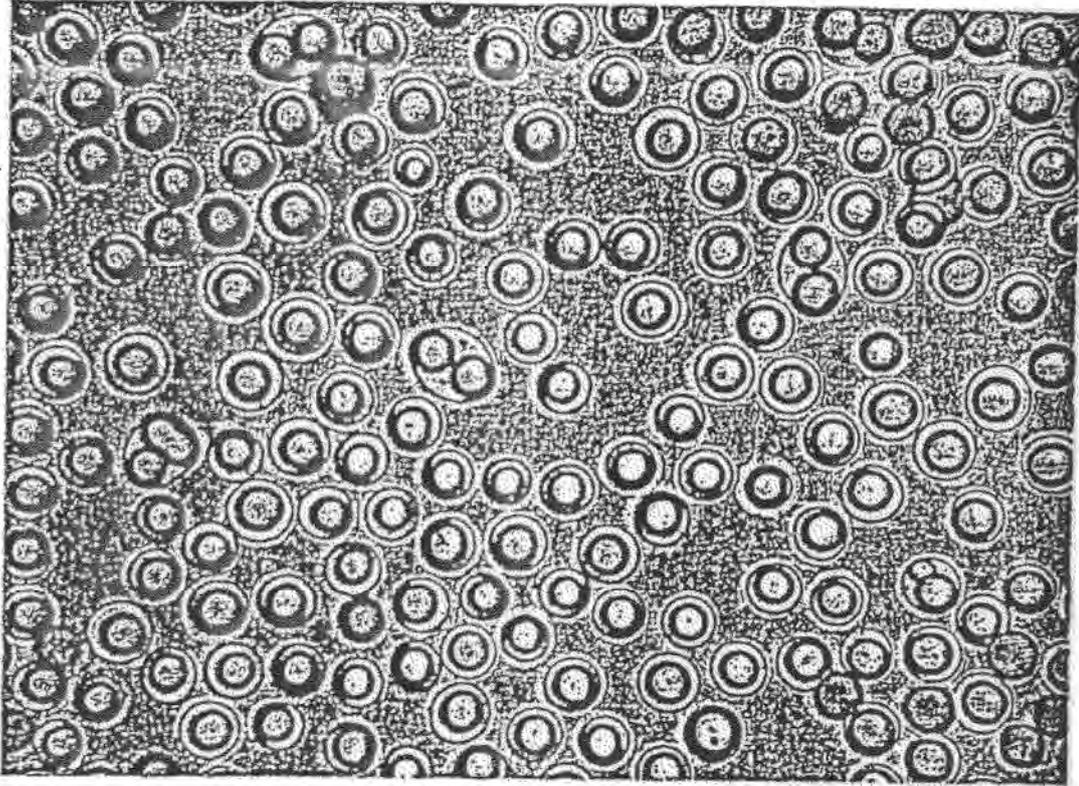


Figura 10