129
724

Clarke, Modet & Cº
COLOMBIA

SEÑORES
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COME
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 00-000788- -00006-0000 Fec: 2006-04-21 17:52:11
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 2 PATENTES Eve 1 REGDEPOSITO
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 10

COD:08

RE.: SOLICITUD DE PATENTE EN COLOMBIA

EXPEDIENTE Nº	**00-00788**
TITULO:	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PACLITAXEL Y OTROS TAXANOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN DE PREPARACIÓN INDUSTRIAL EN UNA COLUMNA DE RESINA POLIMÉRICA.
SOLICITANTE:	JIAN LIU
FECHA SOLICITUD:	07 DE ENERO DE 2001

ASUNTO: CONTESTACIÓN A REQUERIMIENTO OFICIAL

DILIA RODRIGUEZ D´ ALEMAN, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante, por el presente escrito doy respuesta a su auto notificado por estado de 26 de enero de 2006 y vence 24 de abril de 2006 y me permito presentar las siguientes aclaraciones:

Como respuesta a las objeciones realizadas en la acción oficial, que objeta la claridad de invención y cuestiona que el objeto de una de sus reivindicaciones, el solicitante presenta nuevo capítulo reivindicatorio, que reemplaza el original que obra en la solicitud, y fue redactado para remediar las observaciones efectuadas por ese Despacho.

El nuevo capítulo reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del artículo 34, toda vez que las modificaciones efectuadas solo precisan y clarifican el objeto de la invención.

Así las cosas, en el nuevo capítulo reivindicatorio la expresión "extractante orgánico" ha sido modificado por "solvente orgánico" y la expresión "medio absorbente" ha sido modificada por "agente absorbente". Adicionalmente, los términos "análogos", "por lo menos" y "fuente de planta" han sido eliminados.

Siguiendo con cuestionamientos realizados por falta de claridad, conforme a sus objeciones sobre el título, el solicitante ha decidido eliminar la palabra "PACLITAXEL" del título de la invención, siendo el nuevo título "AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE TAXANOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN DE PREPARACIÓN INDUSTRIAL EN UNA COLUMNA DE RESINA POLIMÉRICA."

ES UNA INVENCIÓN

En relación con el cuestionamiento que ese despacho realizó a la reivindicación 4 indicado que su objeto no es patentable toda vez que se trata de compuestos aislados de la naturaleza, nos permitimos enfatizar que el objeto de la invención en ningún momento y de ninguna manera es el compuesto o compuestos aislados.

Respetuosamente, le recordamos a ese despacho que el de acuerdo con el artículo 51 el alcance de la protección está específicamente dado por las reivindicaciones, y la reivindicación 4 es muy clara en establecer en su preámbulo que su alcance es un método de aislamiento de taxanos, y no está dirigida ni hace mención al compuesto.

Siendo así es claro que el método de aislamiento de la presente invención es patentable, siempre y cuando sea novedoso, inventivo y tenga aplicación industrial, puesto que ni es una materia aislada de la naturaleza ni es un procedimiento esencialmente biológico que son las excepciones que el artículo 15 de la Decisión 486,

establece por no ser consideradas una invención.

Ahora bien, el que se caracterice del método indicando que la fuente de taxanos es una planta que se selecciona entre un grupo reducido a 5 especies de plantas, no puede ser interpretada en el sentido que se está protegiendo la planta o la materia existente en la naturaleza, es decir, los compuestos que dicha planta de manera natural ha elaborado, tales como los taxanos.

La única interpretación valedera y posible de la reivindicación 4 es que el solicitante está reclamando un método que el desarrolló y que como parte de dicho desarrollo ha establecido que cumpliendo la condición de que la fuente sea Taxus brevifolia, Taxus baccata, Taxus walichiana, Taxus yunnanensis y Taxus canadensis el método funciona mejor, así que está en su derecho de especificar y proteger el método que se caracteriza porque comprende las etapas mencionadas en la reivindicación 1 y que adicionalmente cumple con la condición de que la fuente de los taxanos sea una de las 5 plantas mencionadas anteriormente.

Adicionalmente, nos permitimos manifestar que una condición del proceso es perfectamente una característica válida para definir un proceso, pues su cumplimiento o no lleva a que el proceso cumpla de una mejor manera con su objetivo, en este caso, la condición de que la fuente de los taxanos sea una de las citadas plantas garantiza la optimización del aislamiento y la obtención de taxanos mediante el proceso reivindicado, así que es absolutamente valedero reivindicar el proceso que cumple con dicha característica.

Siendo así no hay razón para que el método de la reivindicación 4 no sea considerado patentable.

Por lo tanto, se solicita respetuosamente a la Oficina de Patentes Colombiana retirar todas las objeciones.

132
127

Clarke, Modet & Cº
COLOMBIA

Agradezco continuar con el presente trámite.

Señor Jefe,

DILIA RODRIGUEZ D´ALEMAN
MRO/SR

133
a
128

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES
2000-10

1) SOLICITUD DE:

☐ Corrección de error material ☒ Modificación a una solicitud

2) SOLICITANTE	Nombre: JIAN LIU Dirección: 470 Cherry Avenue Fredericton, New Brunswick E3A 5N9 Canada Nacionalidad o Domicilio: Brunswick, Canadá Lugar de Constitución: Teléfono: Fax: E. Mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ

4) NUMERO DE EXPEDIENTE: 00000788

5) DESCRIPCIÓN DE LA CORRECCIÓN O MODIFICACIÓN SOLICITADA:

Se presenta nuevo capítulo reivindicatorio que reemplaza el anterior.
Se cambia el título como: AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE TAXANOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE BAJA PRESIÓN DE PREPARACIÓN INDUSTRIAL EN UNA COLUMNA DE RESINA POLIMÉRICA.

6) Comprobante de pago No. 06-25,846 Fecha: ABRIL 3, 2006

7) Anexos:
☒ Comprobante de la tasa
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Certificado de Existencia y Representación legal, cuando el solicitante sea persona Jurídica

8)
Nombre: DILIA RODRÍGUEZ D´ALEMAN

Firma:

C.C.: 41.654.882 TP: 20824 CSJ

P-290

P290 134
$ 129

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 25.846
FECHA : ABRIL 3 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

CONSIGNANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55055818	03/04/2006	7,532,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	95,000.00
		TOTAL : $	95,000.00

SON: NOVENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

135
130

REIVINDICACIONES:

1. Un método para aislar y purificar análogos de taxano a partir de una fuente que contiene taxanos, que comprende los pasos de:
   - extractar una fuente de taxanos en un solvente orgánico;
   - recubrir un agente absorbente débil con dicho solvente y cargar dicho agente en una columna, conteniendo la referida columna un material absorbente;
   - eluir, en una primera etapa, con una mezcla de solvente orgánico a una presión de entre 10 y 20 psi para generar fracciones que contienen compuestos de taxano;
   - cristalizar dichas fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrar dicho licor madre; y
   - eluir, en una segunda etapa, con una mezcla de solvente polar el mencionado licor madre a través de una resina polimérica para proveer un segundo compuesto de taxano.

2. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, incluyendo adicionalmente el paso de eliminar impurezas de lignano y flavonoide en dicha primera etapa.

3. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicha fuente de dichos taxanos es una planta.

4. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 3, en donde dicha planta es seleccionada a partir de un miembro del grupo que comprende Taxus brevifolia, Taxus baccata, Taxus walichiana, Taxus yunnanensis y Taxus canadensis.

5. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 3, en donde dichos taxanos incluyen 13-acetil-9-dihidrobaccatin III, 10 deacetilbaccatin III, baccatin III, cefalomanina, paclitaxel.

6. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho solvente orgánico comprende diclorometano.

7. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho agente absorbente de producto comprende Celite 545.

8. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho material absorbente comprende oxido de aluminio.

9. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de solvente orgánico de la primera etapa comprende hexano y acetona.

10. Un método de aislar y purificar taxanos a partir de una fuente que contiene taxanos, que comprende los pasos de:
    - proveer una fuente de dichos taxanos;
    - extractar dichos taxanos a partir de dicha fuente en un solvente orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;
    - tratar un material de soporte con dicha capa orgánica;
    - proveer una columna de baja presión conteniendo un material absorbente;
    - eluir, en una primera etapa, un solvente orgánico a través de dicha columna para eluir fracciones de taxano purificado;
    - cristalizar dichas fracciones de taxano para proveer un primer compuesto taxano y un licor madre;
    - eluir, en una segunda etapa, dicho licor madre a través de una resina polimérica en una columna cromatográfica para purificar y eluir un segundo compuesto taxano y un tercer compuesto taxano; y
    - recoger los compuestos taxano separados.

11. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 10, incluyendo adicionalmente la etapa para eliminar impurezas de lignano y flavonoide en dicha primera etapa.

12. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 10, incluyendo adicionalmente la etapa de moler dicha fuente de taxanos y extraer con metanol.

13. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 12, incluyendo adicionalmente la etapa de mezclar extracto con carbón de leña, filtrar y evaporar para formar un concentrado.

14. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 13, en donde dicho material de soporte consiste en Celite 545.

15. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, en donde dicho solvente orgánico comprende una mezcla de acetona y hexano.

16. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 15, en donde dicho solvente orgánico es pasado por dicha columna a una presión de entre 10 y 20 psi.

17. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 1, incluyendo adicionalmente el paso de recoger y analizar dichas fracciones de taxano por cromatografía de capa fina.

18. Un método de aislamiento y purificación de taxanos a partir de una fuente que contiene taxanos, que comprende los pasos de:
    - proveer una fuente de dichos taxanos;
    - extraer los referidos taxanos de dicha fuente en un solvente orgánico para proveer una capa orgánica que contenga compuestos de taxano;
    - tratar un material de soporte con la capa orgánica;
    - proveer una columna de baja presión conteniendo un material absorbente;
    - eluir, en una primera etapa, a una presión de entre 10 y 20 psi, un solvente orgánico a través de dicha columna para eluir fracciones de taxano

purificado y eliminar impurezas de flavonoide y lignano;

- cristalizar dichas fracciones de taxano para proveer un primer compuesto taxano y un licor madre;
- eluir, en una segunda etapa, a una presión de 30 psi, el mencionado licor madre a través de una resina DVB poliestireno en una columna cromatográfica para purificar y eluir por lo menos un segundo compuesto taxano y un tercer compuesto taxano
- eluir, en una tercera etapa, dicho segundo compuesto de taxano y dicho tercer compuesto de taxano a través de una columna de gel de sílice de fase normal para purificar dicho segundo taxano y el referido tercer taxano; y
- recolectar los compuestos taxano separados.

19. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 18, en donde dicho segundo compuesto taxano comprende baccatin III y dicho tercer compuesto taxano comprende 10-deacetilbaccatin III.

20. El método, como se ha expuesto en la reivindicación 18, en donde dichos compuestos tienen una pureza de 98%.

ción manual. Éstos se basan en la suposición de que la forma del pico es gaussiana y mientras no dan la verdadera superficie del pico, los resultados obtenidos son proporcionales a ella y pueden ser utilizados con igual confianza. Algunos de los métodos usados para la integración son:

Triangulación. Se trazan tangentes a los puntos de inflexión del pico desde la línea de base hasta el punto donde se encuentran por encima del pico. El tercer lado del triángulo se dibuja a lo largo de la línea de base y la superficie se determina multiplicando el ancho de la base por la mitad de la altura. El valor resultante es igual al 96% de la superficie real del pico gaussiano.

Altura multiplicada por el ancho a nivel de la mitad de la altura. Se unen con una línea recta las porciones de la línea de base del cromatograma antes y después del pico. Se mide la altura desde esta base y se multiplica por el ancho a la mitad de la altura. El resultado es igual al 84% de la superficie verdadera.

Altura. Si se controlan rigurosamente las condiciones de temperatura y velocidad de flujo, la altura del pico producido por una cantidad dada de soluto será constante de una corrida a otra. Por lo tanto puede ser usada directamente como una estimación de la superficie.

Corte y pesada. En este método se cortan los picos con tijeras y se pesan en una balanza analítica. Aunque esto es muy tedioso. es más preciso que cualquiera de los tres procedimientos anteriores. Si los picos son extremadamente estrechos se los puede trazar sobre una hoja delgada de aluminio o plomo de grosor uniforme, antes de cortarlo, con el fin de aumentar la cantidad que será pesada.

Integración por computadora. La computadora, o integrador, convierte el voltaje análogo producido por el detector en una cantidad digitalizada y computa los resultados. Éste es por lejos el método más preciso, y se puede aplicar a picos cuya forma no es idealmente gaussiana.

Una vez que se han determinado las superficies relativas de los picos del cromatograma, estos datos, que son proporcionales a la concentración de cada una de las especies, deben usarse para determinar las concentraciones exactas. Esto se lleva a cabo de tres maneras:

Normalización de la superficie. Se supone que cada sustancia de la mezcla inyectada produce un pico separado en el cromatograma. El peso del material en cualquier pico se determina mediante el cociente de su superficie de pico respecto de la suma de las superficies totales de todos los picos y multiplicando esto por el peso total del soluto en la cantidad inyectada. Este método se usa poco dado que la presunción inicial usualmente no es válida.

Estandarización externa. Se disuelve un material estándar de referencia puro correspondiente a la sustancia que se va a determinar en un solvente a una concentración conocida. Se inyectan en forma sucesiva cantidades exactamente medidas de esta solución, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 y 5 µL. Las superficies de cada uno de los picos producidos se grafican versus la masa del soluto inyectado y se hace una curva de calibración. Después se inyecta la solución desconocida, se determina la superficie del pico y se halla la concentración por interpolación. Este método es muy exacto, pero es necesario que el analista tenga experiencia en el uso de jeringas en el orden del microlitro o que se use un instrumento automático, dado que los volúmenes inyectados deben medirse con exactitud. También se supone que los parámetros de los instrumentos permanecen constantes durante el período en el cual se introducen las muestras, proposición que no siempre es válida.

Estandarización interna. Para obviar la dificultad de introducir cantidades medidas con precisión dentro de un CG, se puede usar el método del estándar interno. Este procedimiento requiere dos estándares: el estándar analítico, que es una muestra pura del compuesto que se va a determinar, y el *estándar interno*. Éste normalmente es una sustancia que eluye en una posición cercana a la sustancia que se va a analizar y está bien resuelto ($R_S > 1{,}25$), pero que no debe de convertirse en la sustancia que se analiza bajo las condiciones del análisis. Se prepara una serie de soluciones que contienen cantidades variadas del estándar analítico y cantidades constantes del estándar interno. Se efectúa cromatograma de éstas y se determina una curva de calibración mediante la graficación del cociente de las superficies de los dos picos versus los cocientes de sus concentraciones. Se disuelve entonces el desconocido en en solvente adecuado, se agrega la misma cantidad del estándar interno y se obtiene el cromatograma de la mezcla. Se calcula el cociente de superficies e, interpolando en la curva de calibración, se determina la cantidad del desconocido. Ésta es la técnica que se utiliza más a menudo para el análisis cuantitativo mediante la CG debido a que no es necesario conocer la cantidad exacta de la solución inyectada. La práctica usual es preparar una solución del estándar interno en el solvente empleado para disolver los estándares de referencia o las muestras, con lo cual se aseguran cocientes invariables de las superficies de los picos estándar o de las muestras con respecto a la del estándar interno.

Cromatografía líquida

Aunque Michael Tswett publicó en 1906 un trabajo completo sobre la cromatografía líquida, en el cual explicó claramente la naturaleza del proceso y su apreciación acerca de su potencial, el método no fue adoptado ampliamente hasta después de muchos años de su publicación. En 1941, Martin y Synge, quienes no habían tenido éxito al usar la extracción por contracorriente para la separación de aminoácidos en muestras de lana, desarrollaron un proceso de cromatografía líquida en el cual utilizaron una columna empaquetada que contenía gel de sílice saturado en agua y una fase móvil de butanol-cloroformo. Estos autores perfeccionaron las técnicas experimentales y explicaron los aspectos teóricos del proceso tan detenidamente que en 1952 se les otorgó el Premio Nobel por este trabajo. Desde entonces la cromatografía líquida se ha convertido en una de las técnicas más versátiles de las que dispone el analis

a su sencillez y capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones basadas en características tan diversas como polaridad de los solutos, su naturaleza iónica, peso molecular, su capacidad de partición o su capacidad para formar complejos de afinidad.

El término cromatografía líquida se usa en la actualidad para referirse a los métodos en los cuales la separación se produce dentro de una columna empacada. El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidades adsortivas de exclusión o un soporte inerte revestido con una película líquida. Se usa una fase líquida móvil como eluyente. Aunque las cromatografías en capa delgada y en papel utilizan una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida, difieren en que las separaciones tienen lugar en una superficie plana en vez de en una columna.

La cromatografía líquida puede realizarse utilizando dos métodos: 1) el procedimiento clásico desarrollado por Tswett, denominado *cromatografía de columna abierta*, en el cual se deja fluir la fase móvil a través de la columna empaquetada bajo la influencia de la gravedad o, a lo sumo, baja presión, por ejemplo 50 a 100 psi, o 2) el procedimiento en el cual se fuerza la fase móvil a través de la columna empaquetada bajo alta presión. Este último método se denomina *cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)* debido a que se obtienen eficiencias extremadamente altas (tanto como 50.000 platos por metro) o *cromatografía líquida de alta presión*, debido a las altas presiones requeridas (1.000 a 3.000 psi). En la HPLC, el diámetro típico de partícula es 10 µm o menos, y como resultado las columnas son empaquetadas de manera más ajustada y desarrollan altas contrapresiones que necesitan bombear la fase móvil a través de la columna.

Ya sea que se utilizan métodos de la HPLC o de columna abierta, el modo de separación depende principalmente de la naturaleza de la fase estacionaria. Hay cinco modos disponibles: la adsorción, la partición, el intercambio iónico, la exclusión de tamaño y la afinidad. Cada uno de ellos se analiza en detalle a continuación.

Cromatografía de adsorción. En este modo de cromatografía líquida, como en la cromatografía gas-sólido, los solutos son retenidos como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para unirse a ellos temporalmente, a nivel de su superficie activa. Las fuerzas involucradas suelen ser relativamente débiles y sólo son eficaces sobre distancias cortas. Éstas incluyen las fuerzas de van der Waals y de London, interacciones dipolo y dipolo inducidas con grupos polares sobre la superficie activa, fuerzas de transferencia de carga y uniones hidrógeno. Con este tipo de unión, denominada *adsorción física*, la energía requerida para romper las uniones es pequeña y la fase móvil, mediante su capacidad para disolver y desplazar los solutos, puede contrarrestar eficazmente estas fuerzas atractivas. Por lo tanto, un proceso cromatográfico eficiente puede estar basado en la competencia que existe entre la disolución del soluto en la fase móvil y la fijación a la superficie de la fase estacionaria. Sin embargo, cuando se forman uniones químicas más fuertes entre los solutos y el adsorbente, como en el proceso de *quimioadsorción*, la fase móvil no está capacitada para proveer energía suficiente para desadsorber los solutos. En este caso, no se llega al equilibrio entre las dos fases y los solutos son adsorbidos en forma irreversible o dan picos de elución no satisfactorios y con colas.

Cuadro 32-1. *Adsorbentes usados en la cromatografía en columna*

Sacarosa	(el más débil)
Almidón	↓
Inulina	↓
Talco	↓
Carbonato de calcio	↓
Fosfato de calcio	↓
Magnesia	↓
Gel de sílice	↓
Silicato de magnesio	↓
Alúmina	↓
Carbón	(el más fuerte)

En el cuadro 32-1 se enumeran algunas de las sustancias más comunes que han sido usadas como adsorbentes, entre la gran variedad existente. Para determinar la utilidad de un adsorbente potencial, además de la adsortividad son de fundamental importancia el área de superficie, el tamaño de las partículas y la actividad superficial. Es necesaria una gran superficie para proveer un contacto eficaz entre las dos fases y asegurar un intercambio frecuente del soluto. Aunque los proveedores de adsorbentes citan superficies de 5 a 200 m^2/g, estos valores pueden ser menores que la superficie efectiva real, dado que los métodos de medición usados no toman en cuenta en forma exacta la naturaleza porosa de las partículas adsorbentes o la forma verdadera de las moléculas de soluto. Es importante el tamaño de las partículas, no sólo como un indicador de la superficie, sino también porque determina la resistencia de la columna empacada al flujo del solvente. Mientras que las partículas muy pequeñas pueden proveer una gran superficie para la interacción de los solutos, pueden empacarse tan ajustadamente que no se alcance una velocidad de flujo razonable sin utilizar técnicas de alta presión con una pérdida consecutiva de la capacidad de la muestra. Las partículas cuyo diámetro es del orden de los 75 a 150 µm son útiles para la cromatografía de columna abierta ya que proveen una gran superficie con buena permeabilidad. La actividad superficial se refiere a la energía del sitio activo del adsorbente y puede variar según la naturaleza de la sustancia y la cantidad de agua adsorbida. Con el fin de proporcionar una superficie reproducible es habitual activar un adsorbente mediante calenta-

134
Gennaro, A. "Remington, Farmacia." Ed. Médica Panamericana. 19ª edición. Madrid (España). 1995.
139

Cuadro 32-2. *Características de los solventes usados en cromatografía*

Solvente	*Valor eluotrópico, E^o*	*Constante dieléctrica*	*Parámetro de solubilidad*
Heptano	0,00	1,92	7,4
Hexano	0,01	1,88	7,3
Isoctano	0,01	1,94	7,0
Ciclohexano	0,04	2,02	8,2
Tetracloruro de carbono	0,18	2,24	8,6
Tolueno	0,29	2,38	8,9
Benceno	0,32	2,27	9,2
Éter etílico	0,38	4,33	7,4
Cloroformo	0,40	4,81	9,1
Cloruro de metileno	0,42	8,93	9,6
Tetrahidrofurano	0,45	7,58	9,1
Acetona	0,56	20,7	9,4
Dioxano	0,56	2,25	9,8
Acetato de etilo	0,58	6,02	8,6
Acetonitrilo	0,65	37,50	11,8
Piridina	0,71	12,30	10,4
1-Propanol	0,82	20,33	10,2
Etanol	0,88	24,30	11,2
Metanol	0,95	32,70	12,9
Ácido acético	largo	6,15	12,4
Agua	largo	78,54	21,0

miento para expeler la mayor parte del agua y entonces desactivarlo hasta un nivel deseado mediante la exposición a un clima de humedad conocida, con lo cual vuelve una cantidad conocida de humedad al adsorbente.

Entre los adsorbentes comúnmente usados, el gel de sílice y la alúmina poseen superficies ricas en grupos oxhidrilo y átomos de oxígeno y por lo tanto interaccionan fuertemente con los solutos polares. El carbón, activado a 1.000 °C para hacerlo no reactivo con los compuestos polares, posee una superficie muy porosa que retarda el proceso de adsorción-desadsorción y lo hace más susceptible a la quimioadsorción. Las separaciones sobre carbón se basan principalmente en el peso molecular; los compuestos más grandes se retienen más fuertemente. El silicato de magnesio posee una superficie ácida característica de los silicatos insolubles y es similar a la alúmina en cuanto a sus propiedades adsortivas.

En el cuadro 32-2 se ofrece una lista de los solventes más comúnmente usados en la cromatografía líquido-sólido catalogados en un orden estándar, es decir de acuerdo con su energía relativa de adsorción por unidad de superficie sobre alúmina. Un listado como éste se denomina *serie eluotrópica* y, aunque las energías relativas de adsorción difieren ligeramente sobre otras superficies, la elección de solventes se hace usualmente de acuerdo con esta serie. Una excepción a esto, se hace en el caso del carbón, donde debido a su tendencia a adsorber sustancias no polares, se revierte el orden de la fuerza del solvente.

Cuando se elige un solvente para una separ... en particular se deben considerar las propiedade... los solutos y también la fase estacionaria. Por ej... plo, si un grupo de compuestos muy polares debe ... pararse usando gel de sílice, el solvente debe ser ... suficientemente polar para superar la fuerte atracci... existente entre los solutos y la superficie o si no re... sultarán altos tiempos de retención. Si se debe anali... zar una mezcla de solutos menos polares es necesario ... usar un solvente más débil para permitir un tiempo ... retención más prolongado en la columna y mayor ... cantidad de equilibraciones entre las fases. Para un ... análisis más detallado de los métodos utilizados para ... correlacionar la estructura del soluto con el tiempo de ... retención cuando se utiliza la cromatografía de adsor... ción, se recomienda el texto de Synder (véase *Bibliografía*).

Cromatografía de partición. En esta forma de cromatografía líquida, las mezclas de solutos se separan de acuerdo con las tendencias relativas de sus componentes para dividirse entre una fase móvil y una fase estacionaria que consta de una capa de líquido colocada sobre la superficie de un soporte sólido o unida a él. El líquido está presente como una capa extremadamente delgada, de modo que la equilibración entre las fases se puede alcanzar rápido mediante la reducción de la difusión de los solutos en la fase estacionaria. La superficie del soporte sólido a menudo se trata, por ejemplo, mediante sililación, con el fin de eliminar los efectos adsortivos.

Aunque fue utilizada con éxito en muchos análisis, la cromatografía de partición líquido-líquido hasta hace relativamente poco tiempo no se consideraba un método conveniente para uso experimental. La fase líquida debía ser colocada sobre el soporte sólido mediante la evaporación de una solución o por medio de la inyección de ésta sobre la columna con la fase móvil fluyendo. En cualquiera de los casos, era difícil obtener fases estacionarias estables y reproducibles. Además, la elección de la fase móvil estaba necesariamente restringida a aquellas en las cuales la cobertura líquida tenía solubilidad limitada. Por ejemplo, si se debía usar un polietilenglicol para proveer una fase estacionaria muy polar, era necesaria una fase móvil de hexano o algún otro hidrocarburo de muy baja polaridad. Incluso en este caso, la fase estacionaria líquida debía ser despegada lentamente pero en forma continua de la columna, con lo cual se modificaban las caraterísticas de la separación. Con el fin de prevenir el despegado, se saturaba la fase móvil con el material de la fase líquida o se insertaba una precolumna con una elevada concentración de la fase líquida sobre un soporte sólido, dentro del sistema antes de la columna analítica. En cualquier caso, si se cambiaba la naturaleza de la fase móvil y los coeficientes de partición se hacían menos favorables.

Recientemente se han solucionado los problemas presentados por fases estacionarias inestables mediante el desarrollo de la *cromatografía de fase unida*, en la cual la fase líquida se halla siempre unida

...micamente a la superficie del soporte sólido. El ... de sílice, con su alta población de grupos oxhidri... en la superficie, proporciona un medio excelente ... sobre el cual se pueden unir varias sustancias utili...zando agentes sililantes sustituidos adecuadamente. Por ejemplo, el cloruro de octadecildimetilsililo reacciona con el gel de sílice para formar una fase estacionaria estable y no polar denominada ODS (octadecilsililo). Debido a los efectos estéricos, no todos los grupos oxhidrilo del gel de sílice se derivan por el reactivo ODS, de modo que a los que quedan se los hace reaccionar con cloruro de trimetilsililo en un proceso denominado *cobertura* (o *cobertura final*) para reducir los efectos de la adsorción. Las fases unidas son ventajosas dado que se pueden reproducir de lote a lote y la superficie no cambia durante el proceso cromatográfico. Presentan las desventajas de ser caras y eficaces sólo en un intervalo de pH dentro del cual el esqueleto del gel de sílice es estable, usualmente un pH de 2 a 7. Sin embargo, si se compara con los inconvenientes del método anterior estas desventajas no son muy restrictivas y el desarrollo de nuevas fases unidas usando un soporte polimérico estable por encima de un intervalo de pH de 1 a 13 promete aliviar este problema.

La cromatografía de partición puede llevarse a cabo de dos maneras: *en fase normal* o *en fase invertida*. En el modo de fase normal la fase estacionaria es una sustancia polar, como el polietilenglicol o la superficie de sílice no tratada, y la fase móvil es no polar, por ejemplo, hexano. Bajo estas circunstancias los compuestos polares se retardan de modo preferencial y las sustancias no polares eluyen más rápidamente. En la cromatografía de fase invertida la fase estacionaria es no polar, por ejemplo, ODS, y la fase móvil es polar, usualmente una mezcla de agua, metanol y acetonitrilo juntos o por separado. Los compuestos no polares se retienen más fuertemente por este sistema, mientras que los solutos polares eluyen primero. Las separaciones de fase invertida son los métodos que se usan con más frecuencia en la HPLC.

Debido a la eficiencia y la disponibilidad de los materiales de fase invertida, especialmente el ODS o el tipo C-18, se han efectuado intentos de usarlos para separar mezclas de compuestos iónicos, por ejemplo, aminoácidos. Normalmente estos compuestos no serían retenidos en un empaquetamiento de fase invertida, dado que son demasiado polares para separarse en forma apreciable sobre la fase estacionaria no polar. Se han desarrollado varias técnicas, las cuales implican alterar la fase móvil para permitir una cromatografía satisfactoria de compuestos iónicos usando estas fases estacionarias. Estos métodos se denominan *cromatografía de supresión iónica, cromatografía de apareamiento iónico* o *cromatografía de "jabón"*.

La supresión iónica se utiliza para sustancias tales como los ácidos débiles ($pK_a > 2$) y bases débiles ($pK_a < 8$), que sólo están parcialmente ionizados a los valores neutros de pH característicos de las fases móviles usuales. Por ejemplo, un ácido carboxílico con $pK_a = 5$ en un pH = 7 estará presente en forma ionizada y no ionizada con predominio del carboxilato aniónico en una relación de 100 a 1. Con el fin de aumentar la retención de la sustancia en un sistema de fase invertida, se puede ajustar el pH de la fase móvil a un valor lo suficientemente bajo como para suprimir la ionización del ácido, por ejemplo, pH < 3. Esto hace que predomine el ácido libre y, dado que es mucho menos polar que el anión, será capaz de dividirse dentro de la fase estacionaria.

Para ácidos o bases más fuertes que permanecen ionizados en el intervalo de pH (2 a 7) en el cual el sílice es estable, la cromatografía de apareamiento iónico es la técnica de elección. En este método se agrega a la fase móvil un reactivo que se disocia para dar iones de carga opuesta respecto de los solutos. Aunque el mecanismo de acción aún no ha sido completamente explicado, los iones agregados pueden interactuar con los solutos cargados de dos maneras.

Primero, pueden combinarse directamente con los solutos cargados para formar pares iónicos no polares que se dividirán con más facilidad en la fase estacionaria.

Alternativamente, el extremo no polar del reactivo de apareamiento iónico puede dividirse dentro de la fase estacionaria y su extremo polar queda extendido desde la superficie en la fase móvil, donde actúa como un intercambiador de iones.

En cualquiera de los casos, la retención de solutos iónicos en los materiales de la fase invertida está aumentada. Los ejemplos de reactivos de apareamiento iónico son el ácido heptanosulfónico, utilizado para especies catiónicas, como las aminas protonadas y el hidróxido de tetra-*n*-butilamonio, que se aparea con sustancias aniónicas.

El tercer método, la cromatografía de "jabón", es realmente una forma de apareamiento iónico en la cual el reactivo agregado es un detergente o un jabón. Los ejemplos son el laurilsulfato de sodio para los cationes y el cloruro de cetiltrimetilamonio para los aniones. La cromatografía de jabón es especialmente útil para separar proteínas, dado que el jabón no sólo neutraliza la carga en la molécula sino que además afecta la conformación de la proteína de una forma que le permite interactuar más favorablemente con la fase estacionaria. Los aspectos prácticos de la cromatografía de apareamiento iónico se tratan con más detalles en el texto de Gloor y Johnson.[5]

Otra técnica especial que puede utilizarse con la cromatografía de partición es la *formación de complejos de iones metálicos*. En este proceso se agrega una pequeña cantidad de un ion metálico, por ejemplo, Ag^+, a la fase móvil en la cromatografía de compuestos olefínicos. La plata iónica interactúa con los dobles enlaces, forma complejos de transferencia de carga y altera el comportamiento de partición del soluto olefínico. Esta técnica es útil para separar mezclas de compuestos que difieren en la extensión y la colocación de la insaturación.

Cromatografía de intercambio iónico. Aunque las técnicas de apareamiento iónico han demostrado ser útiles en muchos casos para separar mezclas de sustancias iónicas, el método usual para analizar estos compuestos es la *cromatografía de intercambio iónico*. Este método proporciona un mayor grado de selectividad debido a que puede emplearse un mayor número de combinaciones de las fases móvil y estacionaria. Es especialmente útil para los cationes inorgánicos, los aminoácidos o grupos similares de compuestos estrechamente relacionados.

Los materiales de la fase estacionaria usados para efectuar estas separaciones se denominan *intercambiadores iónicos* y comprenden un grupo de polímeros naturales o sintéticos orgánicos o inorgánicos que son capaces de extraer iones de modo reversible de una solución, mientras que al mismo tiempo los reemplazan con iones de carga equivalente. Durante este proceso de intercambio, debe cumplirse en todo momento el principio de electroneutralidad tanto en el intercambiador iónico como en la solución. Un intercambiador iónico contiene *iones fijos*, que son incorporados en forma permanente dentro de su esqueleto insoluble, y *contraiones* débilmente unidos que tienen carga opuesta a la de los iones fijos y pueden ser intercambiados cuando son adsorbidas especies cargadas de la solución. Si los contraiones poseen carga positiva, el material se denomina *intercambiador de cationes*; si poseen carga negativa es un *intercambiador de aniones*.

Los polímeros inorgánicos que se utilizan en este tipo de cromatografía son aluminosilicatos que poseen estructura de enrejado o tipo jaula. Debido a la preponderancia de átomos de oxígeno en el polímero, éste se halla cargado negativamente y los contraiones, usualmente calcio o sodio, son positivos. Por lo tanto, son intercambiadores de cationes. Los miembros de este grupo que existen en forma natural se denominan *zeolitas*, mientras que los sintéticos, que se desarrollaron para proveer estructuras estandarizadas con tamaños de poro constante, se llaman *tamices moleculares*. Debido a sus bajas capacidades para el intercambio iónico, estas sustancias inorgánicas se utilizan principalmente para la separación de las moléculas pequeñas por tamaño.

Los materiales de intercambio iónico más frecuentemente usados son los copolímeros orgánicos hechos de estireno (vinilbenceno) y divinilbenceno (DVB). El estireno se polimeriza para formar cadenas largas y retorcidas de átomos de carbono, con un anillo bencénico carbono por medio. El divinilbenceno se agrega para entrecruzar estas cadenas y dar una estructura tridimensional similar a cuentas. Las resinas de intercambio iónico comercialmente disponibles se identifican de acuerdo con su porcentaje de entrecruzamiento como × 2, × 4, × 6, etc, que corresponde al porcentaje inicial de DVB en la mezcla de reacción.

Dado que los copolímeros de estireno-DVB no tienen propiedades intrínsecas intercambiadoras de iones y actúan sólo como un esqueleto, se deben agregar grupos funcionales cargados. La reacción con ácido clorosulfónico coloca un grupo de ácido sulfónico sobre cada uno de los anillos bencénicos no unidos, lo que produce un *intercambiador catiónico fuerte*, es decir uno en el que los contraiones pueden ser extraídos con facilidad de los iones fijos. Si en la polimerización se usa ácido metacrílico en lugar de estireno, el copolímero resultante tiene grupos ácidos carboxílicos adosados al esqueleto y funciona como un *intercambiador catiónico débil*, o sea, uno en el cual los contraiones no se disocian a un pH bajo. Pueden formarse resinas *intercambiadoras aniónicas fuertes* a partir del mismo esqueleto si se introducen grupos funcionales de tipo amina cuaternaria, mientras que las *intercambiadoras aniónicas débiles* utilizan políaminas como los grupos ionizables.

Se emplean muchas otras sustancias como componentes esqueléticos y como grupos funcionales para intercambio de iones. Los polímeros de hidrato de carbono, como el dextrano y la celulosa, cuando se utilizan como la matriz insoluble cambian la selectividad de una resina. Por ejemplo, los iones soluto con grupos poliaromáticos adosados, como los ácidos antraquinona sulfónicos, no se pueden cromatografiar bien en intercambiadores iónicos basados en poliestireno, dado que se asocian demasiado fuertemente con los anillos bencénicos de la resina. Sin embargo, en un intercambiador basado en celulosa, la separación es posible ya que el mecanismo se limita por completo al proceso de intercambio iónico. También se usa gel de sílice como matriz de soporte para preparar intercambiadores iónicos, en especial en la HPLC, en la cual la fuerza de la partícula es importante, dado que no debe romperse por la alta presión de operación del sistema.

Otros grupos funcionales que se usan con frecuencia son el dietilaminoetilo (DEAE) y el trietilaminoetilo (TEAE), los cuales son intercambiadores de aniones, y el carboximetilo (CM), que se utiliza en resinas intercambiadoras de cationes. Estas sustancias, adosadas a las matrices de celulosa o dextrano, han sido ampliamente empleadas para la separación de proteínas y péptidos.

El mecanismo de acción de esta forma de cromatografía depende del reemplazo de los contraiones de la resina por las especies iónicas que se deben separar. Esto puede ser ilustrado por el procedimiento utilizado para purificar agua mediante su pasaje a través de una resina mixta. Usando cloruro de sodio como contaminante típico, el mecanismo es:

$$(1)\ \text{RESINA} - SO_3H + Na^+ = \text{RESINA} - SO_3Na + H^+$$

$$(2)\ \text{RESINA} - N(CH_3)_3OH + Cl^- = \text{RESINA} - N(CH_3)_3Cl + OH^- \quad (13)$$

El agua de pureza excepcionalmente alta necesaria para hacer fases móviles para la HPLC se prepara

mediante una columna de intercambio iónico, seguida por un pasaje a través de una columna de adsorción de carbón para extraer los compuestos orgánicos no ionizables y que luego se microfiltran para excluir materias particuladas y bacterias.

En una mezcla de iones de soluto de carga diferente, se retienen con preferencia las especies más altamente cargadas. De este modo, en una resina de ácido sulfónico, la alúmina se fija con más fuerza que el calcio y éste más fuertemente que el sodio. La fijación de especies con carga negativa a las resinas de intercambio de aniones fuertes sigue la misma tendencia. Si se consideran sustancias de carga igual, la retención se relaciona con el tamaño de los iones hidratados: los más pequeños se retienen más fuertemente. Dado que los elementos más pequeños de la tabla periódica fijan más moléculas de agua, sus iones hidratados son más grandes y por lo tanto para los metales alcalinos el orden de retención es $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$.

Otro parámetro que afecta la retención es la naturaleza de los sustituyentes adosados a la porción cargada de la especies de soluto. Las resinas de poliestireno muestran preferencia por los iones que contienen grupos aromáticos por sobre los grupos alifáticos porque, además de la unión debida a las fuerzas electrostáticas del intercambio iónico, los grupos aromáticos del soluto interactúan directamente con el esqueleto de la resina.

Los cromatogramas de intercambio iónico pueden desarrollarse por desplazamiento o por métodos de elución. En el primer caso, uno de los iones, que es retenido más fuertemente que cualquiera de los otros contenidos en el soluto, desplaza a éstos de la resina y resulta una serie continua de bandas (véase fig. 32-4). En el método de elución, el agente eluyente es un ion para el cual la resina tiene menos selectividad que para el resto de los del soluto. La transferencia de los iones de soluto hacia la resina y desde ella depende de sus equilibrios de intercambio con el ion eluyente. El cromatograma resultante consta de una serie de picos gaussianos separados, como se observa en la figura 32-5.

Las fases móviles que se utilizan en la cromatografía de intercambio iónico usualmente son soluciones salinas acuosas que pueden ser tamponadas a un pH deseado o ajustadas a una fuerza iónica constante. La elección de la fase móvil depende del conocimiento sobre la selectividad de la resina para los iones de soluto y de la influencia de los equilibrios de la solución debidos al pH o formación de complejos. Pueden emplearse solventes mixtos acuosos-orgánicos o solventes orgánicos si la fase estacionaria no se altera. Para las separaciones difíciles se utiliza la elución por gradiente.

El *cromatoenfocado*, descrito por primera vez en 1978 por Sluyterman y Elgersma[6], es un método especial de cromatografía de intercambio iónico de gran utilidad para la separación de mezclas de proteínas. En este caso se agrega un buffer ajustado a un pH específico a una columna de intercambio aniónico ajustada previamente a un pH diferente. A medida que se mezclan los buffers, se forma un gradiente de pH a lo largo de la columna, que va desde el pH inicial en el extremo final hasta el pH del buffer agregado en el comienzo. Si el pH en el comienzo de la columna es menor que el punto isoeléctrico de la proteína que se analiza, llevará una carga positiva y no interactuará con el intercambiador de aniones. En su lugar, migrará a lo largo de la columna hasta un punto en el cual el pH es sólo mayor que el punto isoeléctrico, momento en el cual adquirirá una carga negativa y se fijará a la resina. De este modo, se dispondrá un grupo de proteínas en la columna en orden de sus puntos isoeléctricos. A medida que el gradiente de pH se mueve hacia abajo en la columna, las proteínas migrarán hacia la parte inferior y permanecerán cargadas negativamente hasta que cada una de ellas eluya de la columna en su punto isoeléctrico. Por lo tanto, es posible fraccionar mezclas complejas de proteínas si se utiliza este método de separación.

Cromatografía por exclusión de tamaño. La *cromatografía por exclusión de tamaño*, también denominada *cromatografía en gel*, es una técnica eficiente para separar grupos de solutos que se basa en su tamaño efectivo en solución. Las fases estacionarias utilizadas para lograr estas separaciones son polímeros que han sido entrecruzados de modo que formen una red abierta con numerosos poros de tamaño uniforme. El grado de entrecruzamiento se controla cuidadosamente para obtener una serie de geles con diferentes tamaños de poro e intervalos de fraccionamiento. Cuando se hace pasar una fase móvil que contiene una mezcla de solutos de diversos tamaños a través de una columna de estos materiales, las moléculas demasiado grandes para entrar dentro de los poros son "excluídas" y permanecen en la fase móvil. Por lo tanto, son eluidas con rapidez cerca del volumen de elución. Las moléculas de menor tamaño pueden difundir libremente dentro y fuera de los poros de modo que, en efecto, su trayectoria a través de la columna es más larga y eluirán más tarde como se muestra en la figura 32-10. El grado de retención depende del tamaño de las moléculas incluidas respecto del tamaño de los poros. De este modo, las moléculas más pequeñas penetrarán a todos los poros, mientras que las de tamaño intermedio, debido a la velocidad de la fase móvil, no tendrán suficiente tiempo para difundir dentro de todos los poros en los cuales penetrarían normalmente y por lo tanto serán retenidas con menor eficacia. El resultado es un cromatograma que consta de un pico inicial que contiene todas las sustancias totalmente excluidas, seguido de un grupo de picos que representa todas las sustancias que han sido retenidas de modo parcial y separadas y por último otro pico causado por todos los solutos incluidos totalmente.

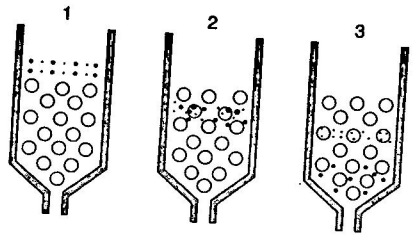


Fig. 32-10. Cromatografía por exclusión de tamaño. Las moléculas solubles pequeñas (•) penetran los poros del gel (○) y son retardadas. Las macromoléculas (●) son excluidas de la matriz del gel y eluyen primero.

Las fases estacionarias usadas en este tipo de cromatografía de partición son de dos tipos.

Los geles blandos habitualmente se hacen de hidratos de carbono entrecruzados, como el dextrano (*Sephadex*), la agarosa (*Sepharosa*) o la poliacrilamida (*Bio-Gel*), cuyo uso fue descrito por primera vez por Porath y Flodin.[7] Éstos son muy hidrófilos y antes de que se empaque la columna se los debe mezclar con la fase móvil hasta que se hayan *embebido* lo suficiente de líquido como para hincharse por completo. Una vez que se ha empaquetado la columna, la composición de la fase móvil no se puede alterar, dado que esto cambiaría la cantidad de solvente embebido y daría como resultado un encogimiento del lecho cromatográfico o una posterior hinchazón, que puede romper la columna. Estos geles se usan con fases móviles primariamente acuosas y la técnica se denomina *filtración en gel*. Debido a la baja fuerza estructural de los geles blandos no se los puede utilizar en condiciones de alta presión. Se han desarrollado medios de exclusión por tamaño hechos de gel de sílice con tamaños de poro controlados para la HPLC; no se deforman bajo presión y pueden ser usados con fases móviles acuosas o no acuosas.

Los *geles rígidos o semirrígidos* están formados por materiales como poliestireno entrecruzado, perlas de vidrio de porosidad controlada o dextrano alquilado. Éstos pueden usarse para la separación de polímeros orgánico-soluble si se utilizan fases móviles no acuosas, como el cloroformo, la acetona, la piridina o el tetrahidrofurano. Esta técnica se denomina *penetración en geles* y fue descrita por primera vez en 1964 por Moore.[8]

De manera ideal, el único mecanismo de separación en la cromatografía por exclusión de tamaño debería ser el que depende de la difusión de solutos dentro y fuera de los poros. Sin embargo, según la naturaleza del soluto y de la fase estacionaria, otros mecanismos de retención, como el intercambio iónico, la partición hidrofóbica o las uniones hidrógeno, pueden ejercer algún efecto sobre ciertos solutos. Éstos pueden dar como resultado largos tiempos de retención, adsorción irreversible o pérdida de la actividad de las moléculas biológicas. Estas dificultades pueden reducirse cambiando la fuerza iónica o el pH de la fase móvil para disminuir los efectos de carga o usando aditivos, tales como los detergentes, que modifican la forma y la carga de las moléculas biológicas.

La cromatografía por exclusión de tamaño se utiliza más a menudo en procedimientos que involucran grandes moléculas biológicas, como las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos, que no se pueden cromatografiar bien con otras técnicas. Entre los procedimientos para los cuales estos geles son útiles se consideran la desalinización, la concentración, la determinación del peso molecular y la separación.

La *desalinización* a menudo es necesaria para purificar sustancias bioquímicas que han sido separadas de tejidos mediante técnicas que usan buffers y reactivos precipitantes. En este procedimiento se utiliza un gel con un límite de exclusión bastante bajo, es decir, equivalente a un peso molecular de 1.000 a 2.000. Debido a que existen grandes diferencias en el peso molecular de las moléculas biológicas y las sales contaminantes, se pueden usar columnas cortas y altas velocidades de flujo. Las macromoléculas serán eluidas en el volumen de exclusión con poca dilución, mientras que las sales son retenidas en la columna.

Se puede lograr la concentración de soluciones diluidas de moléculas grandes con geles cuyo límite de exclusión es menor que el peso molecular de las sustancias involucradas. La solución se mezcla con una pequeña cantidad de gel seco que absorbe 10 a 20 veces su peso en agua. Algunas sales y moléculas pequeñas también son tomadas, y las macromoléculas quedan en una solución de pH y fuerza iónica casi inalterados, pero con un volumen significativamente disminuido.

Quizás el mayor valor de la cromatografía por exclusión de tamaño consiste en el fraccionamiento y la determinación del peso molecular de las macromoléculas. Dado que el tamaño de una molécula es aproximadamente proporcional a su peso molecular, M, el volumen de elución, V_E, puede ser expresado por la fórmula:

$$V_E = a + b \log M \qquad (14)$$

donde a y b son constantes dependientes de las fases móvil y estacionaria. Para determinar el peso molecular de una sustancia, se debe calibrar el sistema empleando una molécula extremadamente grande, como el azul dextrano, para establecer el volumen de exclusión del sistema, y una sustancia como el óxido de deuterio o sacarosa para determinar el tiempo de retención para un soluto totalmente incluido. Se usa entonces una serie de proteínas o polímeros estándar para calibrar la región entre estos límites. En la figura 32-11 se muestra una curva típica de calibración de V_E versus $log\ M$ para una serie de estándares de proteínas. Una vez que se determina el volumen de elución del compuesto desconocido, el peso molecular se puede estimar por interpolación.

Cromatografía de afinidad. En situaciones en las que se desea obtener separaciones muy específicas, puede emplearse *la cromatografía de afinidad*, una forma altamente especializada de la cromatografía de adsorción. En esta técnica se emplea un ligando específico, que ha sido inmovilizado mediante la unión química a una matriz insoluble, para adsorber de manera reversible una sola especie molecular de una mezcla de solutos. Este método difiere de los otros tipos de cromatografía ya discutidos en que en lugar de intentar separar una mezcla de solutos para realizar análisis cualitativo o cuantitativo, sólo tiene que ver con la extracción de una especie única de la mezcla. Logra su mayor utilidad como una técnica altamente específica de purificación para moléculas biológicas.

La cromatografía de afinidad debe su alto grado de especificidad a la naturaleza de las fuerzas de unión existentes entre el ligando y la sustancia que se va a purificar. Muchas moléculas biológicas, como resultado de su estructura y conformación únicas, forman uniones fuertes y no covalentes con compuestos relacionados, como lo haría una droga con su receptor celular. Se encuentran ejemplos de esto en la asociación de enzimas con coenzimas, de antígenos con anticuerpos, de lecitinas con hidratos de carbono o de polinucleótidos con ácidos nucleicos. Si cada miembro de los pares mencionados se une de manera permanente a una matriz cromatográfica, podrá extraer el otro de una solución sin interactuar de manera significativa con ningún otro soluto de la mezcla. Dado que la unión molécula blanco-ligando es reversible, se puede hacer pasar una fase móvil adecuada a través de la columna para disociar el par y eluir la sustancia purificada. Un ejemplo de la utilidad de esta técnica es la purificación del interferón A para realizar estudios estructurales y pruebas clínicas.[9]

Factores experimentales e instrumental

Cromatografía en columna clásica. El equipo experimental para realizar este tipo de cromatografía es relativamente sencillo. La columna dentro de la cual se empaca la fase estacionaria consta de un tubo de vidrio o teflón, típicamente de 10 a 50 mm de diámetro y 5 a 100 cm de largo, aunque se han usado columnas mucho más largas y anchas para separaciones difíciles y trabajos preparativos. El fondo de la columna se ajusta con una llave u otro mecanismo que restrinja el flujo con el fin de proporcionar control sobre la velocidad de flujo de la fase móvil. El material de empaquetamiento se soporta dentro de la columna mediante un disco de vidrio poroso o una pieza de lana de vidrio.

El relleno se puede introducir en la columna en la forma de un polvo seco o como una suspensión en la fase móvil. En cualquiera de los casos, es esencial que el lecho cromatográfico sea uniforme, sin burbujas de aire o canales que interrumpan el flujo de la fase móvil. Si se empaca en forma seca, la fase estacionaria se introduce en pequeñas cantidades y se deja asentar con la ayuda de un suave golpeteo o una vibración fuera de la columna. Si se usa una técnica de introducir una suspensión, se deja abierta la llave para que el solvente fluya a través del material sólido y se agrega solvente, cuando sea necesario, para evitar que se seque la columna, mientras que se dan golpecitos para disipar las burbujas de aire. Cuando el lecho cromatográfico ha alcanzado la altura deseada, se cierra la llave y se deja una capa de fase móvil encima del lecho. Cuando se usa la suspensión, se puede utilizar presión positiva, vacío o una varilla para asegurarse que el material esté firmemente empacado.

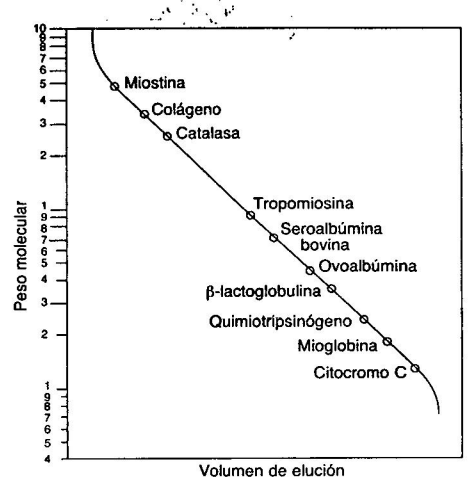


Fig. 32-11. Curva de calibración por exclusión de tamaño típica de volumen de elución, V_E, versus $log\ M$ para una serie de estándares de proteínas.

La muestra se coloca en la parte superior de la columna de dos maneras. Puede mezclarse con una pequeña porción de la fase estacionaria, que entonces se empaca como antes, o puede disolverse en la fase móvil y depositarse sobre el empaquetado después que se ha dejado correr la fase móvil una corta distancia dentro de la fase estacionaria. Se agrega luego más fase móvil y se abre la llave para que comience a fluir la fase móvil. Entonces se puede desarrollar el cromatograma dejando que fluya el solvente desde un reservorio bajo la fuerza de la gravedad o introduciéndolo a baja presión por medio de una bomba peristáltica. El efluente que sale de la columna se recoge en fracciones en función del tiempo o del volumen y los eluidos se analizan para buscar la presencia de los diversos solutos.

Cromatografía líquida de alto rendimiento. Debido a que se requieren presiones relativamente al-

138

143

2006-06-08
375

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C., 01 de junio de 2006

P-290

Doctora
DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMÁN
(Apoderado)

ASUNTO	Radicación	000788
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	6264
	Folios	011

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 32 a 52) y las reivindicaciones modificadas 1 a 20 (Folios: 135 a 138); asimismo, los documentos adjuntados y respuesta a los conceptos técnicos 040 y 041 (folios: 105 a 133).

La presente solicitud reivindica prioridad americana Nº US9.226192 de 07 de enero de 1999 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

La presente solicitud se titula: "Aislamiento y purificación de paclitaxel y otros taxanos mediante cromatografía de baja presión de preparación industrial en una columna de resina polimérica".

El objeto de la presente solicitud se refiere a una técnica de separación y más particularmente la presente solicitud se refiere a técnicas para separar paclitaxel y otros taxanos relacionados.

Según la descripción, el paclitaxel es un fármaco quimioterapéutico bien conocido para el tratamiento de varios cánceres metastásicos. Ha sido probado por la FDA y la HPB para el tratamiento de cánceres de ovario y de mama.

El componente es un producto natural, extraido primariamente de la corteza del árbol de tejo del Pacífico. Taxus brevifolia, y también es encontrado en T. Baccata, T. Walichiana, T. Yunnanensis y T. Canadensis.

La concentración del paclitaxel en varias materias primas es típicamente baja, por ejemplo en el orden de entre 0,0004 y 0,01% (p/p) en la corteza del tejo del Pacífico.

Dicha baja concentración hace que la extracción y la purificación del componente a un grado farmacéutico a partir de la materia prima sean un gran desafío y, hasta ahora, que no sean prácticas a escala comercial. Se han desarrollado varias técnicas de cromatografía de columna de baja y alta presión, para purificar el paclitaxel a partir de un extracto crudo de materia prima.

De acuerdo con la presente solicitud la fuente inicial de taxanos fue el material de planta Taxus canadensis que es abundante en el este de Canadá. Se utilizaron las ramillas y espinas del Taxus canadensis o una mezcla de ellas. El material puede ser natural o deshidratado.

Lo que se reivindica como novedoso es lo siguiente:

Un método para aislar y purificar análogos de taxano a partir de una fuente que contiene taxanos, que comprende los pasos de:

* Extractar una fuente de taxanos en un solvente orgánico.
* Recubrir un agente absorbente débil con dicho solvente y cargar dicho agente en una columna, conteniendo la referida columna un material absorbente.
* Eluir, en una primera etapa, con una mezcla de solvente orgánico a una presión de entre 10 y 20 psi para generar fracciones que contienen compuestos de taxano.
* Cristalizar dichas fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrar dicho licor madre, y
* Eluir, en una segunda etapa, con una mezcla de solvente polar el mencionado licor madre a través de una resina polimérica para proveer un segundo compuesto de taxano.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C07D 305/14; A61K 31/335.

Claridad de la solicitud:

El artículo 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: "Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

De acuerdo con lo anterior, analizando el nuevo capítulo reivindicatorio, se observa que todavía tiene varios términos que son muy generales y ambiguos, creando confusión, como por ejemplo: "fuente que contiene taxanos" (cuál es dicha fuente), "solvente orgánico" (a cuál se refieren), "agente absorbente débil" (no se menciona cuál), "por lo menos", entre otros.

En la reivindicación 18 (folios: 137 y 138) se mencionan unos pasos del proceso muy generales, que conllevan a confusión, como por ejemplo: "eluir, en una segunda columna, a una presión de 30 psi... para purificar y eluir por lo menos un segundo compuesto taxano, y un tercer compuesto taxano", no se mencionan cuáles compuestos son ni el solvente empleado. Además, no se emplean las unidades de medida acordes con el Sistema Internacional. Los siguientes dos pasos, también son muy generales.

140

Es una invención:

El artículo 15 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "No se consideran invenciones: a) los descubrimientos, las teorías científicas y los métodos matemáticos; b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural; c) las obras literarias y artísticas o cualquier otra protegida por el derecho de autor; d) los planes, reglas y métodos para el ejercicio de actividades intelectuales, juegos o actividades económico-comerciales; e) los programas de ordenadores o el soporte lógico, como tales; y, f) las formas de presentar información."

Las reivindicaciones: 3, 4, 5 (folio: 135), 19 (folio: 138) que mencionan que la fuente de taxanos es una planta, seleccionada de un grupo de especies de las mismas, y se dice que los compuestos taxanos son: 13-acetil-9-dihidrobaccatin III, 10 deacetilbaccatin III, baccatin III, cefalomanina, paclitaxel, indica que el método que se está protegiendo emplea material biológico existente en la naturaleza (las plantas o partes de ellas) y lo que se trata de hacer es aislar los compuestos que tienen dichas plantas, por lo cual se puede decir que los compuestos aislados y purificados no se consideran invenciones.

Determinación del estado de la técnica:

El artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de Patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40".

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 07/01/1999, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	Artículo 1[1]	A new taxane diterpenoid from Taxus mairei	1998
2	Artículo 2[2]	Isolation and semi-synthesis of a bioactive taxane from Taxus Canadensis	1996
3	Artículo 3[3]	Taxol and related taxones. I. Taxones of Taxus brevifolia bark	1993
4	Artículo 4[4]	Studies on Pteridium aquilinum var. Latiusculum IV.	1985
5	Artículo 5[5]	Diterpenoid alkaloids from Aconitum crassicaule	1987
6	Libro[6]	Remington Farmacia	1995

Evaluación de los requisitos de Patentabilidad:

El Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina el cual establece: "Los Países Miembros otorgarán Patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

Evaluación de Nivel Inventivo:

El artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La presente Solicitud de Patente reivindica lo siguiente:

Un método para aislar y purificar análogos de taxano a partir de una fuente que contiene taxanos, que comprende los pasos de:

---

1 Shen, YC, Chen CY, Kuo YH. "A new taxane diterpenoid from Taxus mairei". J. Nat. Prod. 26 jun. 1998; 61(6): 838-40.
2 Zamir LO, Nedea ME, Zhou ZH, Caron G, Sauriol F, Mamer O. "Isolation and semi-synthesis of a bioactive taxane from Taxus Canadensis". Phytochemistry. Feb. 1996; 41(3): 803-5.

3 Rao KV. "Taxol and related taxones. I. Taxones of Taxus brevifolia bark". Pharm. Res. Ab. 1993; 10 (4): 521-4. Univ. Of Florida
4 Ojika M, Kigoshi H, Kuyama H, Niwa H, Yamada K. "Studies on Pteridium aquilinum var. Latiusculum IV. Isolation of three p-hydroxystyrene glycosides and an efficient method for the isolation of ptaquiloside an unstable bracken carcinogen. J. Nat. Prod. Jul-Ag. 1985; Vol. 48, N° 4: 634-636
5 Wang Feng-Peng and Pelletier S. W. "Diterpenoid alkaloids from Aconitum crassicaule". J. Nat. Prod. Ene-Feb 1987; Vol. 50, N° 1: 55-62
6 Gennaro, A. "Remington Farmacia". Ed. Médica Panamericana. 19 ed. Madrid (España). 1995

* Extractar una fuente de taxanos en un solvente orgánico.

* Recubrir un agente absorbente débil con dicho solvente y cargar dicho agente en una columna, conteniendo la referida columna un material absorbente.

* Eluir, en una primera etapa, con una mezcla de solvente orgánico a una presión de entre 10 y 20 psi para generar fracciones que contienen compuestos de taxano.

* Cristalizar dichas fracciones para proveer un compuesto de taxano sólido y un licor madre; concentrar dicho licor madre, y

* Eluir, en una segunda etapa, con una mezcla de solvente polar el mencionado licor madre a través de una resina polimérica para proveer un segundo compuesto de taxano.

El documento "Remington Farmacia" (D6) (folios: 139 a 142) menciona principios generales de la cromatografía, especialmente de la cromatografía en columna y de la de intercambio iónico; se observa también que es conocido el empleo de solventes orgánicos para eluir las muestras a separar, a una presión determinada y que el efluente que sale de la columna se recoge en fracciones que luego son analizados, que por lo general se hacen cristalizaciones a dichas fracciones y si es el caso, se vuelven a correr las muestras para purificarlas o para separar más compuestos que quedan después de estos procesos en las denominadas "aguas madres".

Un método cromatográfico más eficiente es el denominado HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) el cual emplea altas presiones; dicho método es más eficiente que el método convencional de la cromatografía en columna.

También en este documento se puede apreciar un listado de solventes comúnmente empleados para cromatografía (ver folio: 140) que, para su elección, se debe tener en cuenta la polaridad del solvente, la polaridad de la muestra a separar, la constante dieléctrica parámetro de solubilidad, entre otros. También se puede observar un listado de los adsorbentes usados en cromatografía en columna (ver folio: 139).

Los documentos 1, 2, 3, 4 y 5 (folios: 107 a 128) mencionan algunos ejemplos de aislamiento y purificación de compuestos extraídos de diferentes partes de plantas vegetales, donde se emplea la extracción de compuestos en estado crudo, empleando solventes convencionales como el cloroformo, el metanol, butanol, acetato de etilo, hexano, entre otros. Entre las especies de plantas mencionadas en dichos artículos se encuentran: Taxus mairei, Taxus canadensis, Taxus brevifolia y los compuestos extraídos y purificados son taxanos.

En los documentos: 1, 2, 3 y 4 se emplea la HPLC para separar las fracciones donde están principios activos que se desean estudiar que, como ya se mencionó, dicho método es más eficiente que el de cromatografía en columna.

En el documento 3 (folio: 114) se observa un esquema de extracción de taxanos, empleando la corteza de T. brevifolia, donde dicho método es muy semejante al método reivindicado en la presente solicitud, es decir, se menciona una fuente de taxanos (corteza de T. brevifolia), solventes orgánicos (cloroformo), cromatografía en columna (CC) empleando un agente adsorbente (sílica gel), la obtención de fracciones que luego se someten a cristalización.

Estos documentos le sugieren a una persona medianamente versada en la materia

el método de extracción con solventes y purificación con CC y posterior cristalización de compuestos, especialmente de taxanos de la presente solicitud; es conocido por cualquier persona medianamente versada en la materia que en una marcha fitoquímica como la descrita y reivindicada en la actual solicitud se debe hacer una extracción de los compuestos a separar partiendo de una parte de una planta (hojas, corteza, raíces, etc.), empleando un solvente.

Es sabido también que se deben separar los compuestos que pueden interferir con el estudio (flavonoides, antraquinonas, taninos, etc.) y esto se hace mediante extracciones con solventes orgánicos en los cuales sean solubles dichos compuestos; es conocido el método de cromatografía en columna para eluir el extracto crudo obtenido, empleando el solvente adecuado, o mezcla de solventes a unas proporciones determinadas, que generalmente se busca por ensayo y error mediante cromatografía en capa delgada (CCD) o haciendo sistemas ternarios.

Dicha elusión se puede hacer a bajas presiones como se dice en la referencia 6 o inclusive más bajas, para lograr la separación de los compuestos y las fracciones deben recolectarse en un volumen también bajo para evitar que se vayan en una misma fracción más de dos compuestos (por ejemplo fracciones de 15 ml) y es más que conocido que al final, dichas fracciones se sometan a un proceso de cristalización para obtener los compuestos en estado sólido, y si es necesario, hacer nuevamente otra cromatografía bien sea en columna o por intercambio iónico (empleando resinas) para separar compuestos que hayan quedado en el solvente remanente o "aguas madres".

La respuesta al problema técnico que se pretendía resolver, resulta obvia partiendo de las anterioridades citadas. Además, en la práctica normal de investigación de compuestos de origen vegetal es comúnmente empleada la marcha fitoquímica que involucra la extracción de dichos compuestos en estado crudo, los cuales deben separarse mediante métodos cromatográficos y cristalizarse para poderlos caracterizar químicamente por medio de técnicas analíticas bien conocidas como son: espectroscopía, difractometría, calorimetría, etc., y así elucidar su estructura química y si es posible el comportamiento polimórfico que pueda tener.

Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

Evaluación de la Aplicación Industrial:

El artículo 19 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará que una invención es susceptible de aplicación industrial, cuando su objeto pueda ser producido o utilizado en cualquier tipo de industria, entendiéndose por industria la referida a cualquier actividad productiva, incluidos los servicios".

El objeto de la presente solicitud cumple con el requisito de Aplicación Industrial.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	Artículo 1[1]	1 a 20	Nivel Inventivo
2	Artículo 2[2]	1 a 20	Nivel Inventivo
3	Artículo 3[3]	1 a 20	Nivel Inventivo
4	Artículo 4[4]	1 a 20	Nivel Inventivo
5	Artículo 5[5]	1 a 20	Nivel Inventivo
6	Libro[6]	1 a 20	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 08 JUN. 2006

CONCEPTO TÉCNICO N°: 891	EXAMINADOR TÉCNICO Código N°: 202005	EXAMINADOR JURÍDICO Código N°:

1 Shen, YC, Chen CY, Kuo YH. "A new taxane diterpenoid from Taxus mairei". J. Nat. Prod. 26 jun. 1998; 61(6): 838-40.
2 Zamir LO, Nedea ME, Zhou ZH, Caron G, Sauriol F, Mamer O. "Isolation and semi-synthesis of a bioactive taxane from Taxus Canadensis". Phytochemistry. Feb. 1996; 41(3): 803-5.

3 Rao KV. "Taxol and related taxones. I. Taxones of Taxus brevifolia bark". Pharm. Res. Ab. 1993; 10 (4): 521-4. Univ. Of Florida
4 Ojika M, Kigoshi H, Kuyama H, Niwa H, Yamada K. "Studies on Pteridium aquilinum var. Latiusculum IV. Isolation of three p-hydroxystyrene glycosides and an efficient method for the isolation of ptaquiloside an unstable bracken carcinogen. J. Nat. Prod. Jul-Ag. 1985; Vol. 48, N° 4: 634-636
5 Wang Feng-Peng and Pelletier S. W. "Diterpenoid alkaloids from Aconitum crassicaule". J. Nat. Prod. Ene-Feb 1987; Vol. 50, N° 1: 55-62
6 Gennaro, A. "Remington Farmacia". Ed. Médica Panamericana. 19 ed. Madrid (España). 1995