

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Orgánica



TESIS DOCTORAL

**VINILSULFONAS, AZIDAS Y ALQUINOS.
APLICACIONES TECNOLÓGICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS.**

presentada por

Julia Morales Sanfrutos

para optar al grado de

Doctor en Química

Granada, 2008

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Julia Morales Sanfrutos
ISBN: 978-84-1117-099-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71583>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (FPU-AP-2003-4773) y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-208 “Química de Carbohidratos: Síntesis, Reactividad y Diseño Teórico”.

**VINILSULFONAS, AZIDAS Y AQUINOS.
APLICACIONES TECNOLÓGICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS.**

por

Julia Morales Sanfrutos

Visado en Granada a 11 de Noviembre de 2008

Fdo: Prof. Dr. D. Francisco Santoyo González
Catedrático del Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Fdo: Dr. D. Francisco Javier López Jaramillo
Doctor Contratado del Departamento de Química
Orgánica.
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Química

Fdo: Julia Morales Sanfrutos

ABREVIATURAS

ABC: *“Avidin-Biotin Complex”*

ABPP: *“Activity-Based Protein Profiling”*.

Ac: Acetilo

Ac₂O: Anhídrido acético.

AcOEt: Acetato de etilo.

AcOH: Ácido acético.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BA: Ácido benzoico.

BN: β-naftol.

BRAB: *“Bridged Avidin-Biotin”*.

BSA: Albúmina Sérica Bovina(*“Bovine Serum Albumin”*).

C: Cisteína.

c: Cuadruplete.

CA: Anhidrasa carbónica.

calc.: Calculado.

c.c.f.: Cromatografía en capa fina.

CD: Ciclodextrina.

CLSM: Microscopía Láser Confocal.

CMC: Carboximetilcelulosa

col.: Colaboradores

ConA: Concanavalina A.

COSY: *“Correlation Spectroscopy”*.

CPD-Y: Carboxipeptidasa Y.

CPMV: Virus del mosaico del caupi.

CuAAC Cicloadiciones 1,3-dipolares de azidas y alquinos terminales catalizadas por Cu(I).

d: Duplete

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.

dd: Doble duplete.

ddd: Doble doble duplete.

desc.: Descompone.

DEPT: *“Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer”*

DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

DIPEA: N-N-Diisopropil-N-etilamina.

Abreviaturas

DMF: N,N-Dimetilformamida.

DMAP: 4-(Dimetilamino)piridina.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

dt: doble triplete.

DTE: Ditioeritritol

DVS: Divinilsulfona.

ECMs: Matrices extracelulares naturales.

EDCI: 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil) carbodiimida.

EDS: Energía dispersiva de rayos X.

ELISA: *"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"*

ELLA: *"Enzyme-Linked Lectin Assay"*.

EMAR: Espectroscopía de masas de alta resolución.

enc.: Encontrado.

EPI: Epiclorhidrina.

Et₃N: Trietil amina.

EVS : Etil-vinilsulfona.

FAB+: Bombardeo por átomos rápidos (*"Fast-Atom Bombardment"*)

FIA : Inmunoensayo por fluorescencia.

FISH: *"Fluorescence in situ hybridation"*.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

FRET: *"Fluorescence Resonance Energy Transfer"*.

Fuc-T: r-1,3-fucosiltransferasa humana.

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GLA: Glutaraldehído.

GSTs: Glutation S-transferas.

H: Histidina.

HA: Ácido hialurónico.

HCCA: Ácido α -ciano-4-hiroxicinamico

HEC: Hidroxietilcelulosa.

HMDI o HMI: 1,6-hexametilendiidocianato.

HMQC: *"Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation"*.

HP: Hidroxipropil.

HPC: Hidroxipropilcelulosa.

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

IC₅₀: Valor del 50% de inhibición.

IR: Espectroscopía de infrarrojos.

ISCOM: *“Immunostimulating complex”*.

ITC: Calorimetría isotérmica de valoración (*“Isothermal Titration Microcalorimetry”*)

kDa: KiloDalton.

K : Lisina

LAB: *“Labeled Avidin-Biotin”*.

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida tándem masas/masas.

m: Multiplete.

MALDI-TOF: Desorción/ionización con láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.
(*“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight”*)

Man: manosa

MBP: Proteína de unión a maltosa (*“Maltose Binding Protein”*).

MC: Metilcelulosa.

MeOH: Metanol.

MPTS : 3-Mercaptopropil-trimetoxisilano.

MVS : Metil-vinilsulfona

MW: Microondas.

NBD : 4-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol.

NDA : Naftalendicarboxaldehído.

NHSS: N-hidroxisulfosuccinimida.

OPA: o-ftalaldehído.

ORMOSILs: *“Organically-modified silicas”*.

P: Fenol.

PA: Peroxidasa de alcachofa.

pA: Polímero de almidón entrecruzado con DVS.

pACOL: Polímero de almidón entrecruzado con DVS en presencia de colina.

Abreviaturas

pAGABA: Polímero de almidón entrecruzado con DVS en presencia de GABA.

pAGly: Polímero de almidón entrecruzado con DVS en presencia de Gly.

pAIDA: Polímero de almidón entrecruzado con DVS en presencia de ácido iminodiacético.

pATA: Polímero de almidón entrecruzado con DVS en presencia de ácido tioacético.

pA β CD: Polímero mixto almidón- β CD entrecruzado con DVS.

pA α CD: Polímero mixto almidón- α CD entrecruzado con DVS.

p β CD: Polímero de β -CD entrecruzada con DVS.

p α CD: Polímero de α -CD entrecruzada con DVS,

PBS: Tampón fosfato salino.

PCP: Pentaclorofenol.

pDCOL: Polímero de dextrina entrecruzada con DVS en presencia de colina.

pDIDA: Polímero de dextrina entrecruzada con DVS en presencia de ácido iminodiacético.

pDTA: Polímero de dextrina entrecruzada con DVS en presencia de ácido tioacético.

PEG: Polietilenglicol.

P.f.: Punto de fusión.

pl: Punto isoeléctrico.

pNP: 4-nitrofenol.

PolyS: Polisacárido.

ppm: Partes por millón.

PS-rodamina: Éster fenilsulfonato de la rodamina.

PVA: Polivinil alcohol.

Py: Piridina.

QS: "*Quorum Sensing*"

RET: Transferencia de energía resonante.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

R_f: Factor de retención.

RX: Rayos X.

s: Singulete

sa: Singulete ancho.

SAM Monocapas autoensambladas.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.

SRP: Resonancia de superficie de plasmón ("*Surface Plasmon Resonance*")

SST: Síndrome del shock tóxico.

STP: 4-sulfo-2,3,4,6-tetrafluorofenol.

t: Triplete.

t.a.: Temperatura ambiente.

t-BuOK: tert-butóxido potásico.

TCEP: *tris*-(carboxietil)fosfina.

TEOS: Tetraetil ortosilicato.

TGase: Transglutaminasa.

TGS: "*Target-Guided Synthesis*".

THF: Tetrahidrofurano.

TLL: "*Thermomyces Lanuginosa Lipase*".

TMOS: Tetrametil ortosilicato.

TRITC: Isotiocianato de tetratrametilrodamina.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

VS: Vinil sulfona.

δ : Desplazamiento químico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

Dentro del concepto de *“click chemistry”* las cicloadiciones 1,3-dipolares de azidas y alquinos terminales catalizadas por Cu(I) (**CuAAC**) son las que han alcanzado un mayor grado de desarrollo y aplicación y se consideran el ejemplo fundamental dentro de este concepto. Desde el descubrimiento de la catálisis de Cu(I) en el año 2002 por los grupos de Meldal y Sharpless el interés por esta reacción ha crecido exponencialmente y no sólo en síntesis orgánica, sino en otros campos como ciencias de los materiales y ciencias biomédicas. Por otro lado, las vinilsulfonas son bien conocidas por su utilidad como intermedios en síntesis orgánica. Estos compuestos han demostrado ser reactivos de síntesis muy versátiles como aceptores de Michael en adiciones conjugadas de tipo 1,4 y en reacciones de cicloadición. Además, este grupo funcional también ha mostrado su capacidad para inhibir potencialmente una variedad de procesos enzimáticos proporcionando unas propiedades únicas que se pueden explotar en el diseño de fármacos.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es explotar la capacidad de las reacciones de **CuAAC** para interconectar de forma fácil y eficiente diversas estructuras y poner de manifiesto la enorme potencialidad que esconden las **vinilsulfonas** como grupo reactivo en diversas aplicaciones. Específicamente se han explorado aplicaciones en el campo de las ciencias *“ómicas”* y en el campo de la eliminación de contaminantes.

1.-Aplicaciones en ciencias *“ómicas”*.

1.1.-Etiquetado de biomoléculas.

El etiquetado de biomoléculas es una herramienta básica en el campo de la genómica y la proteómica para la detección, purificación y estudio de interacciones entre biomoléculas. De entre la gama de biomoléculas que son plausibles, destacan por su especial importancia en aplicaciones biotecnológicas los etiquetados con fluoróforos y con biotina. En este campo los objetivos de la Tesis han sido:

Objetivos

1.1.1-Síntesis de sistemas de etiquetado conteniendo un fluoróforo, biotina o ambos simultáneamente para el marcaje de proteínas.

El etiquetado fluorescente es un elemento clave para la detección y análisis de biomoléculas y el etiquetado con biotina también tiene gran interés biotecnológico. En el caso de la biotina la alta especificidad y afinidad que la avidina y otras proteínas relacionadas presentan por ella (constante de disociación del orden de 10^{-15}M^{-1}) hacen que la interacción tenga fortaleza de enlace covalente sin serlo. Así, la biotinización transforma moléculas difícilmente detectables en sondas que pueden ser detectadas o capturadas con avidina marcada o inmovilizada. En este contexto un objetivo específico de la Tesis ha sido la síntesis de compuestos que contengan una molécula fluorescente, una molécula de biotina o ambas simultáneamente y además un grupo **vinilsulfona**. Por otro lado, dada la capacidad de las **vinilsulfonas** para reaccionar con grupos amino y tiol a través de reacciones de adición tipo Michael se pretende evaluar la capacidad de estos compuestos para el etiquetado de proteínas.

1.1.2-Síntesis de sistemas fluorescentes que permitan realizar estudios de interacción proteína-ligando.

La polarización de fluorescencia es una técnica que proporciona información sobre orientaciones y movilidad, permitiendo estudiar interacciones receptor-ligando. Como proteínas modelo se han seleccionado la Concanavalina A, la MBP (proteína de unión a maltosa) y la avidina. En esta aplicación el objetivo ha sido llevar a cabo la síntesis de sistemas fluorescentes conteniendo un ligando de las proteínas anteriormente citadas (manosa para la ConA, β -CD para la MBP y biotina para la avidina) mediante **CuAAC** utilizando complejos de Cu(I) solubles en disolventes orgánicos. Para la ConA y la MBP se persiguió utilizar la anisotropía de fluorescencia para determinar las constantes de disociación de estos receptores fluorescentes y desarrollar ensayos de competición que permitieran establecer las constantes de afinidad de ligandos no fluorescentes.

Para el caso de la avidina se persiguió desarrollar una metodología basada en anisotropía de fluorescencia que permitiera la determinación de concentraciones efectivas de avidina, de gran importancia en la tecnología avidina-biotina.

1.-Modificaciones post-traduccionales.

De las diferentes modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas una de ellas es la lipidación, siendo la más relevante la acilación con ácidos grasos. Debido al gran número de mecanismos celulares en los que las proteínas modificadas con grupos de naturaleza lipídica se encuentran implicadas, tiene un gran interés el estudio de este tipo de proteínas. El objetivo en este contexto ha sido la síntesis de diversos sistemas de naturaleza lipídica conteniendo la función **vinilsulfona** para aprovechar la reactividad de esta función frente a grupos amino y tiol para llevar a cabo la lipidación de proteínas, en concreto, la lipidación de proteína A, y evaluar la capacidad de esta proteína modificada para incorporarse a ISCOMs. Como sistemas lipídicos se han seleccionado un ácido graso, el ácido oleico, y el colesterol. Este estudio ha sido llevado a cabo por Teresa Cruz Bustos, doctoranda del grupo de investigación Bioquímica y Parasitología Molecular dirigido por el Prof. Antonio Osuna.

1.3. Inmovilización de biomoléculas.

A pesar de los avances que se han producido en los últimos años es necesario llevar a cabo una “activación” bien de la biomolécula o bien del soporte para promover dicha inmovilización. El objetivo en esta área de aplicación ha sido la incorporación de grupos **vinilsulfona** a distintos materiales de sílice (sílica y geles de sílice) y poner de manifiesto la capacidad de estos nuevos soportes para la inmovilización de enzimas y proteínas en condiciones fisiológicas, sin necesidad de catálisis y sin generar subproductos.

2.-Aplicación en la síntesis de nuevos materiales con aplicación en descontaminación.

La contaminación con compuestos orgánicos y metales es un problema frecuente derivado de la actividad industrial o minera en determinadas zonas. Representa un problema ecológico de primera magnitud y desde la entrada en vigo de la Ley de Prevención del Control Integrado de la Contaminación (Ley 16/2002 del 1 de Julio) tiene repercusiones no sólo económicas, pues se legisla el pago de las correspondientes indemnizaciones y además la obligación de reposición de la situación alterada a su estado anterior.

Objetivos

En este marco el objetivo perseguido ha sido la síntesis de nuevos materiales partiendo de polisacáridos como materia prima y DVS como agente de entrecruzamiento. De esta manera se persiguió la obtención de homopolímeros de almidón y ciclodextrinas (α y β) y heteropolímeros de almidón-ciclodextrina y el análisis de la capacidad de los mismos para adsorber diferentes contaminantes modelo orgánicos. Además, persiguió la incorporación de grupos aniónicos y catiónicos sobre la estructura de los polímeros que permitirá su utilización en otros campos. Así, para el caso de los polímeros aniónicos se evaluó su capacidad para la eliminación de metales pesados del agua y los catiónicos fueron utilizados para la adsorción de colorantes con grupos aniónicos en su estructura..

INDICE

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. “Click chemistry”	3
1.2. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares de alquinos y azidas.	4
1.2.1. Generalidades	4
1.2.2. Aplicaciones.	9
1.2.2.1. Desarrollo de fármacos.	9
1.2.2.2. Bioconjugación.	13
1.2.2.3. Inmovilización de biomoléculas.	19
1.2.2.4. Ciencias de los materiales.	24
1.3. Vinilsulfonas.	32
1.3.1. Generalidades y aplicaciones en síntesis.	32
1.3.2. Aplicaciones biotecnológicas.	38
1.3.2.1. Agentes de entrecruzamiento.	38
1.3.2.2. Inmovilización de biomoléculas.	41
1.3.2.3. Modificación de biomoléculas.	42
1.3.2.4. Inhibición de diversos procesos enzimáticos.	45
1.3.3. Otras aplicaciones.	48

CAPÍTULO 2. SINTESIS DE AGENTES BIOTINILANTES Y DE ETIQUETADO FLUORESCENTE BASADOS EN VINILSULFONAS. APLICACIONES.

2.1. Etiquetado de biomoléculas.	53
2.1.1. Aminas.	53
2.1.2. Tioles.	56
2.1.3. Alcoholes.	58
2.1.4. Grupo carboxilo.	59
2.1.5. Otras posibilidades.	60
2.2. Tecnología avidina-biotina.	60
2.2.1. Generalidades.	60
2.2.2. Aplicaciones.	63
2.2.2.1. Cromatografía de afinidad.	63
2.2.2.2. Localización.	64
2.2.2.3. Diagnóstico.	65
2.2.3. Ventajas e inconvenientes del sistema avidina-biotina.	66

2.3. Etiquetado fluorescente.	67
2.3.1. Aplicaciones.	67
2.3.2. Ventajas del etiquetado fluorescente.	73
2.4. Discusión y resultados.	74
2.4.1. Síntesis de agentes de etiquetado sencillos.	74
2.4.2. Síntesis de agentes de etiquetado doble.	79
2.4.3. Etiquetado de proteínas empleando los sistemas de etiquetado sencillo.	83
2.4.4. Etiquetado de proteínas empleando los sistemas de etiquetado doble.	88
2.4.5. Aplicación del reactivo rodamina-vinilsulfona 57 como sistema de tinción previo a la electroforesis.	93
2.4.6. Estudio de selectividad.	96
2.5. Conclusiones.	98
2.6. Sección experimental.	100

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE SISTEMAS FLUORESCENTES MEDIANTE CuAAC. APLICACIONES.

3.1. Lectinas.	125
3.1.1. Clasificación de las lectinas.	126
3.1.2. Funciones y aplicaciones de las lectinas.	128
3.1.3. Características estructurales.	130
3.1.4. Lectinas de legumbres.	130
3.1.4.1. Concanavalina A (ConA).	132
3.2. Proteínas de unión.	134
3.2.1. Funciones de las proteínas de unión.	135
3.2.2. Proteína de unión a maltosa (MBP).	137
3.3. Anisotropía de fluorescencia.	139
3.3.1. Principios Generales.	139
3.3.2. Causas de despolarización.	143
3.3.3. Aplicaciones.	144
3.3.4. Características y ventajas de los ensayos de anisotropía de fluorescencia.	149

3.4. Discusión y resultados.	150
3.4.1. Síntesis de glicoconjugados fluorescentes.	150
3.4.2. Estudios de afinidad de los glicoconjugados fluorescentes con la ConA mediante anisotropía de fluorescencia. Empleo del glicoconjugado fluorescente 97 en ensayos de competición.	155
3.4.3. Síntesis de ciclodextrinas fluorescentes mediante CuAAC.	165
3.4.4. Estudios de afinidad de las CDs fluorescentes con la MBP mediante anisotropía de fluorescencia. Empleo de la CD fluorescente 112 en ensayos de competición.	166
3.4.5. Síntesis de sistemas fluorescentes conteniendo biotina mediante CuAAC.	170
3.4.6. Aplicación de los compuestos biotina-fluoróforo en el establecimiento de la concentración efectiva de avidina mediante fluorescencia.	172
3.5. Conclusiones.	179
3.6. Sección experimental.	181

CAPÍTULO 4. SÍLICE-VINILSULFONA. SÍNTESIS Y APLICACIONES EN INMOVILIZACIÓN COVALENTE.

4.1. Inmovilización de biomoléculas	199
4.1.1. Inmovilización no-covalente.	200
4.1.2. Inmovilización covalente.	202
4.2. Aplicaciones de la inmovilización de biomoléculas.	208
4.2.1. Aplicaciones analíticas	208
4.2.2. Aplicaciones médicas	209
4.2.3. Aplicaciones industriales	209
4.2.3.1 Aplicaciones en la Industria Farmacéutica.	209
4.2.3.2. Aplicaciones en la Industria Alimentaria.	210
4.2.4. Aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales.	211
4.2.5. Otras aplicaciones	212
4.3. Discusión y resultados	213
4.3.1. Funcionalización de sílica con grupos vinilsulfona.	213
4.3.2. Inmovilización de invertasa y lisozima sobre sílica-vinilsulfona (X-VS y T-VS).	216

4.3.3. Funcionalización del gel de sílice con grupos vinilsulfona. Aplicación en inmovilización covalente de proteínas. _____	221
4.4 Conclusiones. _____	233
4.5. Sección experimental. _____	234

CAPÍTULO 5. SÍNTESIS DE LÍPIDOS CONTENIENDO GRUPOS VINILSULFONA. NUEVOS AGENTES DE LIPIDACIÓN.

5.1. Lipidómica. _____	241
5.1. Objetivos de la lipidómica. _____	242
5.2. Lipidación de proteínas: metodologías y aplicaciones. _____	242
5.2 Discusión y resultados. _____	248
5.2.1. Funcionalización del ácido oleico con grupos vinilsulfona. ____	248
5.2.2. Funcionalización del colesterol con grupos vinilsulfona. ____	251
5.2.3. ISCOMs _____	252
5.2.4. Lipidación e incorporación de proteína A a ISCOMs. _____	255
5.2.5. Incorporación del derivado de colesterol-vinilsulfona 126 a la estructura del los ISCOMs. _____	256
5.3. Conclusiones. _____	258
5.4. Sección experimental. _____	259

CAPÍTULO 6. NUEVOS MATERIALES POLIMÉRICOS BASADOS EN POLISACÁRIDOS Y DIVINILSULFONA.

6.1. Polímeros basados en polisacáridos. _____	265
6.1.1. Generalidades. _____	265
6.1.2. Vinilsulfonas como agentes de entrecruzamiento. _____	269
6.1.2.1. Síntesis en medios fuertemente básicos. _____	269
6.1.2.2. Síntesis en condiciones fisiológicas. _____	274
6.1.2.3. Síntesis de heteropolímeros. _____	276
6.1.3 Aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas. _____	277
6.1.3.1. Eliminación de compuestos aromáticos y colorantes. _____	279
6.1.3.2. Eliminación de metales pesados. _____	285
6.2. Discusión y resultados _____	289
6.2.1. Síntesis de polímeros basados en almidón y CDs. Estudios de adsorción de compuestos fenólicos y progesterona. _____	289

6.2.2. Síntesis de polímeros aniónicos de almidón y dextrina. Estudios de adsorción de metales.	303
6.2.3. Estudios de adsorción y desorción de metales en columna.	310
6.2.4. Síntesis de polímeros catiónicos.de almidón y dextrina. Estudios de adsorción de colorantes aniónicos.	313
6.3. Conclusiones.	317
6.4. Sección experimental.	319

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN.

1.1. “Click chemistry”

A principios de este siglo Sharpless y col. introdujeron el concepto de “*click chemistry*”¹, que se ha convertido en una de las estrategias sintéticas más notables dentro de la química contemporánea. Este término engloba a toda una serie de reacciones sencillas, versátiles y de alta eficiencia, tanto en términos de conversión como de selectividad. Estas reacciones deben conducir a la obtención de un solo producto de reacción sin generar subproductos, y sus condiciones deben ser suaves: con disolventes fáciles de eliminar, temperatura ambiente, etc... Además, el aislamiento del producto final debe llevarse a cabo a través de procesos sencillos, evitándose en la medida de lo posible la cromatografía en columna.

Estos autores establecieron cuatro grupos de reacciones que cumplen, en mayor o menor medida, estas características:

- ✓ Cicloadiciones de especies insaturadas, incluyendo cicloadiciones 1,3-dipolares y de Diels-Alder.
- ✓ Reacciones de sustitución, en especial la apertura de heterociclos tensionados.
- ✓ Reacciones carbonílicas no aldólicas: formación de ureas, tioureas, ésteres, hidrazonas, amidas...
- ✓ Adiciones sobre enlaces carbono-carbono insaturados, especialmente procesos de oxidación como epoxidaciones, dihidroxilaciones... incluyendo también las adiciones tipo Michael.

Sin embargo, son las cicloadiciones 1,3-dipolares de azidas y alquinos terminales catalizadas por Cu(I) (**CuAAC**) las que han alcanzado un mayor grado de popularidad y se consideran el ejemplo fundamental de “*click chemistry*”. De hecho, en bibliografía, el término *click* se ha aplicado y se aplica casi exclusivamente a este tipo de reacciones.

1. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, 40, (11), 2004.

1.2. Reacciones de cicloadición 1,3-dipolares de alquinos y azidas.

1.2.1. Generalidades

La reacción de cicloadición de Huisgen de azidas y alquinos fue descubierta en la década de los 60², sin embargo, pasó un tanto desapercibida para la comunidad científica debido a que se trata de una reacción lenta a temperatura ambiente que necesita elevadas temperaturas para conseguir tiempos de reacción relativamente cortos y, además, da lugar a una mezcla de regioisómeros (1,2,3-triazoles 1,4 y 1,5-disustituídos).

Dada la potencialidad de esta cicloadición, numerosos autores han tratado de corregir ambos inconvenientes mediante estrategias basadas en la modificación electrónica de los reactivos^{3,4}, la naturaleza del disolvente⁵, el uso de altas presiones⁶, la aproximación espacial controlada de ambas especies mediante su unión covalente⁷ o empleando reactores supramoleculares y reconocimiento molecular^{8,9}. Sin embargo, estos métodos no son generales y sólo han mostrado eficacia en casos muy puntuales.

2. Huisgen, R., 1,3-Dipolare cycloadditionen - ruckschau und ausblick. *Angewandte Chemie-International Edition* **1963**, 75, (13), 604.

3. Hlasta, D. J.; Ackerman, J. H., Steric effects on the regioselectivity of an azide-alkyne dipolar cycloaddition reaction - the synthesis of human-leukocyte elastase inhibitors. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (21), 6184-6189.

4. Li, Z. M.; Seo, T. S.; Ju, J. Y., 1,3-dipolar cycloaddition of azides with electron-deficient alkynes under mild condition in water. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45, (15), 3143-3146.

5. Wijnen, J. W.; Steiner, R. A.; Engberts, J., 1,3-Dipolar cycloaddition of phenyl azide to norbornene in aqueous-solutions. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, (30), 5389-5392.

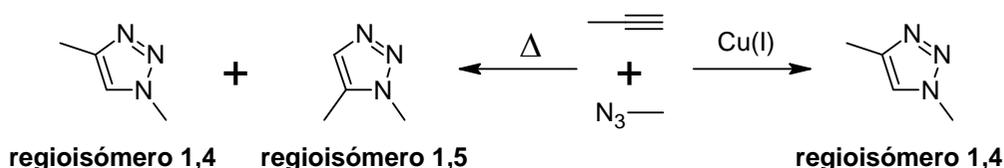
6. Melai, V.; Brillante, A.; Zanirato, P., High pressure assisted 1,3-dipolar cycloadditions: Formation of 1,2,3-triazoles from aryl azides and (trimethylsilyl)acetylene. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1998**, (11), 2447-2449.

7. Garanti, L.; Zecchi, G., Intra-molecular 1,3-cycloadditions of aryl azides with alkynyl substituents - kinetic investigation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1979**, (9), 1176-1178.

8. Mock, W. L.; Irra, T. A.; Wepsiec, J. P.; Adhya, M., Catalysis by curcubituril - the significance of bound-substrate destabilization for induced triazole formation. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, 54, (22), 5302-5308.

9. Howell, S. J.; Spencer, N.; Philp, D., Recognition-mediated regiocontrol of a dipolar cycloaddition reaction. *Tetrahedron* **2001**, 57, (23), 4945-4954.

En el año 2002 los grupos de Meldal¹⁰ y Sharpless¹¹ observaron simultáneamente que el empleo de una cantidad catalítica de Cu(I) reduce considerablemente los tiempos de reacción y, además conduce de forma regioespecífica a la obtención de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos con excelentes rendimientos (**esquema 1.1.**). Este hecho renovó el interés por esta reacción, interés que ha crecido exponencialmente estos últimos años y no sólo en síntesis orgánica, sino en otros campos, como ciencias de los materiales y ciencias biomédicas¹²⁻¹⁸.



Esquema 1.1. Cicloadiciones 1,3-dipolares de alquinos y azidas, catalizada y sin catalizar.

10. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, (9), 3057-3064.

11. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (14), 2596.

12. Kolb, H. C.; Sharpless, K. B., The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, (24), 1128-1137.

13. Wang, Q.; Chittaboina, S.; Barnhill, H. N., Advances in 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azides and alkynes - A prototype of "click" chemistry. *Letters in Organic Chemistry* **2005**, 2, (4), 293-301.

14. Lutz, J. F.; Zarafshani, Z., Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne "click" chemistry. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, (9), 958-970.

15. Dirks, A. J.; Cornelissen, J.; van Delft, F. L.; van Hest, J. C. M.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; Rutjes, F., From (bio)molecules to biohybrid materials with the click chemistry approach. *Qsar & Combinatorial Science* **2007**, 26, 1200-1210.

16. Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A., Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Medicinal Research Reviews* **2008**, 28, 278-308.

17. Pieters, R. J.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J., Application of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction in chemical biology: Approaches toward multivalent carbohydrates and peptides and peptide-based polymers. *Qsar & Combinatorial Science* **2007**, 26, 1181-1190.

18. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D., The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews* **2007**, 36, (8), 1249-1262.

Capítulo 1

Gran parte del éxito de esta reacción reside en las **propiedades de las funciones alquino y azida:**

- ✓ Se pueden introducir fácilmente en moléculas orgánicas mediante reacciones de sustitución y propargilaciones.
- ✓ Presentan una elevada estabilidad en la mayoría de las condiciones utilizadas habitualmente en síntesis orgánica.
- ✓ Son inertes en condiciones biológicas, donde existen moléculas con una alta funcionalización, en presencia de oxígeno molecular y agua.
- ✓ Las azidas son termodinámicamente inestables, en algunas ocasiones se han descrito como compuestos explosivos, pero factores cinéticos hacen que permanezcan prácticamente inertes hasta que reaccionan con un buen dipolarófilo¹⁹.

Desde un punto de vista experimental la reacción es muy sencilla, requiere únicamente cantidades estequiométricas de los productos de partida y prácticamente no genera subproductos. Además, posee un amplio campo de aplicabilidad, una elevada selectividad y la transformación es prácticamente cuantitativa. La reacción puede llevarse a cabo en soluciones acuosas, sin necesidad de tomar precauciones frente al oxígeno, o en disolventes orgánicos, cuando los productos de partida no son solubles en mezclas acuosas. Aunque la catálisis de Cu(I) permite que esta reacción tenga lugar a temperatura ambiente se puede llevar a cabo a reflujo o con radiación de microondas²⁰⁻²³, lo cual reduce notablemente los tiempos de reacción.

19. Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V., Organic azides: An exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (33), 5188-5240.

20. Perez-Balderas, F.; Ortega-Munoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Hernandez-Mateo, F.; Calvo-Flores, F. G.; Calvo-Asin, J. A.; Isac-Garcia, J.; Santoyo-Gonzalez, F., Multivalent neoglycoconjugates by regiospecific cycloaddition of alkynes and azides using organic-soluble copper catalysts. *Organic Letters* **2003**, 5, (11), 1951-1954.

21. Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Frechet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Efficiency and fidelity in a click-chemistry route to triazole dendrimers by the copper(I)-catalyzed ligation of azides and alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, 43, (30), 3928-3932.

22. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E., A microwave-assisted click chemistry synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via a copper(I)-catalyzed three-component reaction. *Organic Letters* **2004**, 6, (23), 4223-4225.

23. Khanetsky, B.; Dallinger, D.; Kappe, C. O., Combining Biginelli multicomponent and click chemistry: Generation of 6-(1,2,3-triazol-1-yl)-dihydropyrimidone libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, 6, (6), 884-892.

Desde el descubrimiento del **efecto catalítico del Cu(I)** se han utilizado con éxito diversas condiciones y fuentes para la generación de Cu(I). El método más ampliamente utilizado ha sido la formación *in situ* de Cu(I) a partir de sales de Cu(II), normalmente $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, y ascorbato sódico¹¹ como agente reductor. Fokin y Sharpless también han explorado el uso de otros agentes reductores como el Cu(0) ^{24,25} y la *tris*-(carboxietil)fosfina (TCEP), este último ha encontrado principalmente aplicaciones en bioconjugación^{26,27}. El segundo método más utilizado es el empleo de sales inorgánicas de Cu(I), generalmente CuI, en presencia de un exceso de base, DIPEA o 2,6-lutidina. En algunas ocasiones las reacciones de cicloadición se han llevado a cabo en presencia de ciertos agentes quelatantes como los compuestos **1**²⁸, **2**²⁹ y **3**³⁰. En este caso no es necesario el empleo de una base ya que sus nitrógenos terciarios además de actuar como donores hacia el Cu(I) actúan como aceptores de protones. Este protocolo es particularmente útil en bioconjugación, donde el uso de otras bases está limitado, pero complica la purificación ya que introduce la necesidad de eliminar el ligando.

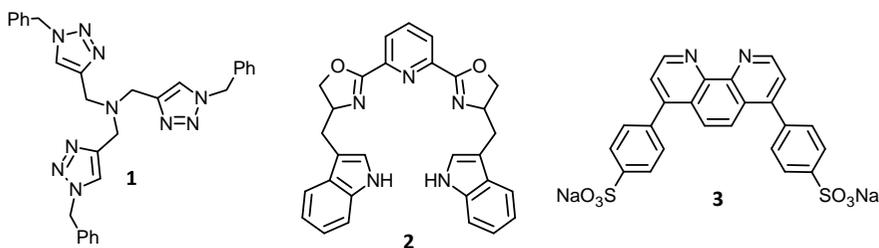


Figura 1.1. Quelatos heterocíclicos como ligandos de Cu(I).

24. Lee, L. V.; Mitchell, M. L.; Huang, S. J.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H., A potent and highly selective inhibitor of human α -1,3-fucosyltransferase via click chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (32), 9588-9589.

25. Deiters, A.; Cropp, T. A.; Mukherji, M.; Chin, J. W.; Anderson, J. C.; Schultz, P. G., Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (39), 11782-11783.

26. Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G., Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (11), 3192-3193.

27. Speers, A. E.; Adam, G. C.; Cravatt, B. F., Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (16), 4686-4687.

28. Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V., Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Organic Letters* **2004**, 6, (17), 2853-2855.

29. Meng, J. C.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Kinetic resolution by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (27), 4543-4546.

30. Lewis, W. G.; Magallon, F. G.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Discovery and characterization of catalysts for azide-alkyne cycloaddition by fluorescence quenching. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (30), 9152-9153.

Capítulo 1

En el caso de sustratos no solubles en medios acuosos, donde es necesario el uso de disolventes orgánicos, el empleo de CuSO_4 /ascorbato o CuI no es del todo eficaz. Para estos casos existen dos **protocolos alternativos**. Uno de ellos consiste en el empleo de catalizadores solubles en disolventes orgánicos, como son los complejos $(\text{Ph}_3)_3\text{CuBr}$, $(\text{EtO})_3\text{PCuI}^{20}$ o $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6^{28,29}$, los cuales solos o en presencia de una base (DIPEA, DBU o Et_3N) conducen a la formación de los productos de cicloadición con excelentes rendimientos. Recientemente se ha descrito el empleo de catalizadores poliméricos, como por ejemplo CuI soportado sobre Amberlita A-21³¹ o nanopartículas de cobre soportadas sobre una fibra de oxihidróxido de aluminio³². Se trata de catalizadores eficientes, estables y que además presentan la posibilidad de poder ser reutilizados.

La última alternativa que ha aparecido para generar Cu(I) en solución consiste en la oxidación de cobre metal. Se utilizan virutas o nanopartículas de cobre en presencia, normalmente, del hidrocloreto de una amina³³ o de “nanoclusters” de cobre³⁴. Este protocolo presenta inconvenientes como la necesidad de largos tiempos de reacción y el elevado coste de las nanopartículas de Cu que limitan su aplicabilidad.

Recientemente, y como un avance más dentro del concepto de “click chemistry”, se ha desarrollado un procedimiento en el que los **azido derivados se generan *in situ*** a partir del correspondiente haluro^{22,35,36} o amino³⁷. Como no es necesario el aislamiento del azido derivado, este protocolo se presenta especialmente útil en aquellos casos en los que hay que trabajar con azidas

31. Girard, C.; Onen, E.; Aufort, M.; Beauviere, S.; Samson, E.; Herscovici, J., Reusable polymer-supported catalyst for the [3+2] Huisgen cycloaddition in automation protocols. *Organic Letters* **2006**, 8, (8), 1689-1692.

32. Park, I. S.; Kwon, M. S.; Kim, Y.; Lee, J. S.; Park, J., Heterogeneous copper catalyst for the cycloaddition of azides and alkynes without additives under ambient conditions. *Organic Letters* **2008**, 10, (3), 497-500.

33. Orgueira, H. A.; Fokas, D.; Isome, Y.; Chan, P. C. M.; Baldino, C. M., Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (16), 2911-2914.

34. Pachon, L. D.; van Maarseveen, J. H.; Rothenberg, G., Click chemistry: Copper clusters catalyse the cycloaddition of azides with terminal alkynes. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2005**, 347, (6), 811-815.

35. Feldman, A. K.; Colasson, B.; Fokin, V. V., One-pot synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles from in situ generated azides. *Organic Letters* **2004**, 6, (22), 3897-3899.

36. Chittaboina, S.; Xie, F.; Wang, Q., One-pot synthesis of triazole-linked glycoconjugates. *Tetrahedron Letters* **2005**, 46, (13), 2331-2336.

37. Beckmann, H. S. G.; Wittmann, V., One-pot procedure for diazo transfer and azide-alkyne cycloaddition: Triazole linkages from amines. *Organic Letters* **2007**, 9, 1-4.

inestables de bajo peso molecular o poliazidas. Recientemente Löber y col.³⁸ han llevado a cabo la síntesis de resinas con grupos azido y alquino que han utilizado para eliminar el exceso de alquino y azido, respectivamente, en las reacciones de CuAAC. Este tipo de sistemas presentan una gran aplicabilidad en síntesis en paralelo. Por último, el grupo de Bertozzi ha descrito reacciones de cicloadición de azidas y alquinos impulsadas o provocadas por tensión de anillo³⁹. Estas reacciones no requieren ningún tipo de catálisis y por ello han sido denominadas **“click chemistry” libre de Cu(I)**⁴⁰. Esta característica hace que tengan un gran interés en las modificaciones covalentes de biomoléculas en sistemas vivos, para los cuales el cobre resulta tóxico.

1.2.2. Aplicaciones.

1.2.2.1. Desarrollo de fármacos.

Las reacciones de CuAAC no sustituyen a los métodos ya existentes para el desarrollo de fármacos, sino que los **complementa y los amplía**. Esta técnica ha dado muy buenos resultados en conjunción con el diseño basado en la estructura y junto con técnicas de química combinatoria. Además, mediante el empleo de productos de partida adecuados permite obtener fácilmente y con una alta eficiencia derivados de farmacóforos, fármacos y productos naturales ya existentes.

El gran potencial de esta reacción en el diseño de nuevos fármacos fue puesto de manifiesto por Wong y col.²⁴ quienes hicieron uso de las reacciones de CuAAC para desarrollar una **metodología “high-throughput”** que les permitió descubrir un nuevo inhibidor selectivo de la r-1,3-fucosiltransferasa humana (Fuc-T), enzima responsable de la catálisis de la etapa final de glicosilación en la biosíntesis y una diana para el desarrollo de fármacos anti-inflamatorios. La mayor parte de la energía de unión de la Fuc-T hacia su sustrato procedía de una unidad

38. Leeb, L.; Gmeiner, P.; Lober, S., Optimization of click chemistry using azide and alkyne scavenger resins. *Qsar & Combinatorial Science* **2007**, 26, 1145-1150.

39. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (46), 15046-15047.

40. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., A hydrophilic azacyclooctyne for Cu-free click chemistry. *Organic Letters* **2008**, 10, (14), 3097-3099.

Capítulo 1

GDP-fucosa y de un bolsillo hidrofóbico adyacente al sitio de unión del enzima por lo que sintetizaron 85 compuestos derivatizados con un grupo azida que contenían un residuo hidrofóbico y una cadena alquílica con diferentes longitudes y los hicieron reaccionar con alquino-GDP en placas ELISA. Una vez finalizadas las reacciones llevaron a cabo, directamente en los pocillos, un “*screening*” de los crudos de reacción. De esta manera consiguieron encontrar el primer inhibidor (**4**) de la Fuc-T con una constante de inhibición en el rango nanomolar (62nM).

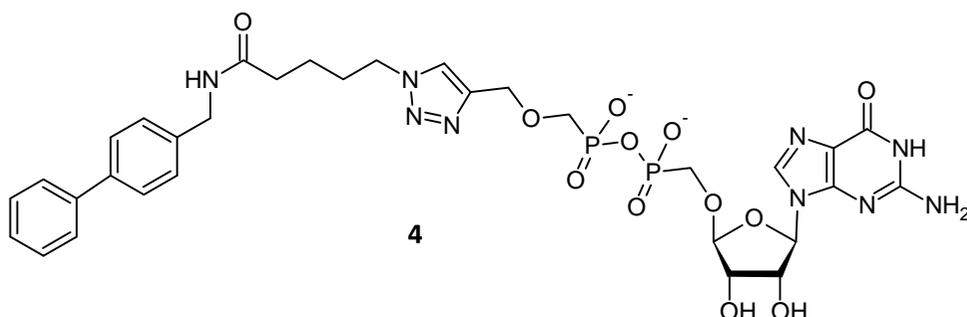


Figura 1.2. Inhibidor de la Fuc-T sintetizado por Wong y col.

En general, la estrategia que normalmente se utiliza para el desarrollo de nuevos fármacos consiste en la síntesis de una librería de compuestos y el subsiguiente “*screening*” biológico. Sin embargo, en la última década se han estudiado nuevas metodologías en las que la diana biológica participa activamente en la síntesis de su propio inhibidor. Esta recibe el nombre de **TGS (“*target-guided synthesis*”)**. En esta aproximación el enzima ejerce un efecto plantilla de tal manera que únicamente aquellos compuestos que encajen perfectamente en el centro activo del mismo podrán reaccionar entre sí, lo que dará lugar a nuevos ligandos específicos de ese enzima. Recientemente varios ejemplos han puesto de manifiesto la eficacia y potencialidad de las reacciones de cicloadición de azidas y alquinos en este campo⁴¹. Las características que hacen que la reacción de cicloadición de alquinos y azidas sea ideal para su empleo en esta **síntesis *in situ* son:**

41. Sharpless, K. B.; Manetsch, R., In situ click chemistry: a powerful means for lead discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2006**, 1, (6), 525-538.

- ✓ Está favorecida termodinámicamente pero a temperatura ambiente la cinética es muy lenta. Sin embargo, en la estrategia TGS el enzima es capaz de situar los grupos reactivos tan próximos entre sí que pueden superar la barrera energética de la reacción sin necesidad del uso de catalizadores ni de altas temperaturas.
- ✓ La reacción no requiere de un tercer participante, como un catalizador u otro reactivo, ni genera subproductos.
- ✓ Biorotogonality.

Por ejemplo, Sharpless y col.^{42,43} han utilizado esta estrategia para identificar inhibidores de la acetilcolinesterasa, enzima que hidroliza la acetilcolina, neurotransmisor en muchas sinapsis, y diana clave en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer. Sintetizaron 16 derivados de tacrina y fenantridina funcionalizados con grupos azida y alquino que se incubaron en presencia del enzima. De todas las combinaciones posibles, 49 reacciones y 98 productos, sólo una de ellas dio lugar a una cantidad detectable del regioisómero 1,5-disustituido **6**. Hasta la fecha este es el inhibidor no-covalente más potente que se conoce de la acetilcolinesterasa, con constantes de disociación en el rango femtomolar. Cabe destacar la especificidad que la enzima le confiere a la reacción ya que el regioisómero 1,4 **5** no se formó *in situ*. Como era de esperar, cuando este regioisómero se sintetizó a través de métodos tradicionales se comprobó que no era un inhibidor tan potente como el que contenía el anillo de triazol 1,5-disustituido, lo que explica que no se formase *in situ*.

Posteriormente Kolb y col.⁴⁴ consiguieron mejorar la sensibilidad del método mediante el empleo de LC/MS y lo aplicaron también al desarrollo de inhibidores de la acetilcolinesterasa. Este aumento en la sensibilidad permite reducir los tiempos de reacción de 6 días a 6 horas ya que es posible detectar

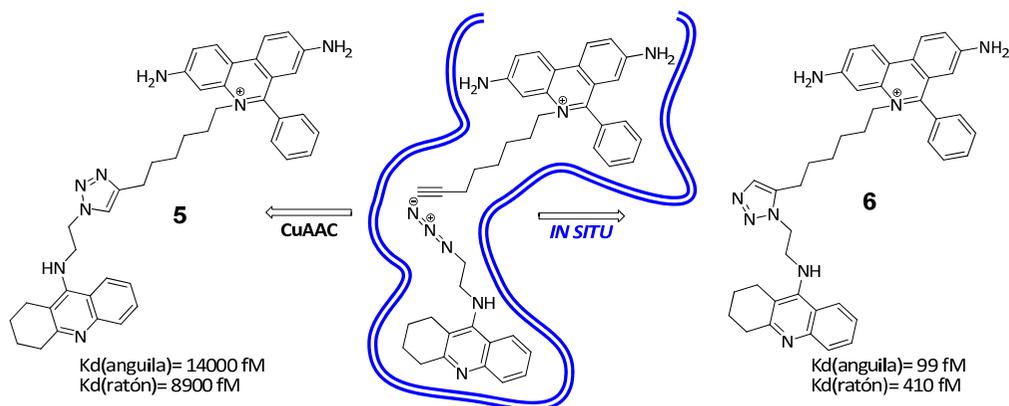
42. Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radic, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click chemistry in situ: Acetylcholinesterase as a reaction vessel for the selective assembly of a femtomolar inhibitor from an array of building blocks. *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, 41, (6), 1053.

43. Krasinski, A.; Radic, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C., In situ selection of lead compounds by click chemistry: Target-guided optimization of acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (18), 6686-6692.

44. Manetsch, R.; Krasinski, A.; Radic, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C., In situ click chemistry: Enzyme inhibitors made to their own specifications. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (40), 12809-12818.

Capítulo 1

cantidades más pequeñas de los productos. Esto aumenta considerablemente la eficiencia de este protocolo en el descubrimiento de nuevos fármacos.



Esquema 1.2. Desarrollo de nuevos fármacos mediante TGS.

La metodología TGS se ha empleado con otras enzimas, como la anhidrasa carbónica (CA)⁴⁵ y la proteasa VIH-1⁴⁶. En el caso de la CA se utilizaron fragmentos que presentaban una afinidad moderada (derivatizados con alquinos) y fragmentos que no presentaban ningún tipo de afinidad (funcionalizados con grupos azida) mientras que en el caso de la proteasa VIH-1 se emplearon fragmentos que presentaban una afinidad débil. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron inhibidores muy potentes frente a los correspondientes enzimas, lo que pone de manifiesto la gran potencialidad de esta metodología. Además, aunque hasta la fecha sólo se han sintetizado inhibidores de enzimas no hay ninguna razón para descartar la posibilidad de identificar ligandos de receptores de esta manera.

Recientemente, y mediante el empleo de chips microfluídicos, se han conseguido llevar a cabo en paralelo hasta 32 reacciones de cicloadición *in situ* con una reducción en el consumo de proteínas, reactivos, así como en el tiempo de reacción. Tseng y col.⁴⁷ han puesto de manifiesto que mediante este nuevo formato

45. Mocharla, V. P.; Colasson, B.; Lee, L. V.; Roper, S.; Sharpless, K. B.; Wong, C. H.; Kolb, H. C., In situ click chemistry: Enzyme-generated inhibitors of carbonic anhydrase II. *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, (1), 116-120.

46. Whiting, M.; Muldoon, J.; Lin, Y. C.; Silverman, S. M.; Lindstrom, W.; Olson, A. J.; Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; Elder, J. H.; Fokin, V. V., Inhibitors of HIV-1 protease by using in situ click chemistry. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (9), 1435-1439.

47. Wang, J. Y.; Sui, G. D.; Mocharla, V. P.; Lin, R. J.; Phelps, M. E.; Kolb, H. C.; Tseng, H. R., Integrated microfluidics for parallel screening of an in situ click chemistry library. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 5276-5281.

se obtienen los mismos resultados que cuando se llevan a cabo las reacciones en una placa ELISA.

1.2.2.2. Bioconjugación.

La bioconjugación es un área que se encuentra en la interfase de la biología molecular y la química. Las técnicas de bioconjugación implican, generalmente, la unión covalente de una etiqueta a una biomolécula, como por ejemplo la modificación de proteínas o ácidos nucleicos con un fluoróforo, un radioisótopo o biotina, u otro tipo de modificaciones como son la unión de dos o más proteínas o la unión de un oligosacárido a un péptido. Una de las grandes ventajas de las reacciones de CuAAC en este campo es, sin lugar a dudas, su quimioselectividad. Esta característica junto con la posibilidad de llevar a cabo las reacciones en medios acuosos ha permitido su empleo en la modificación de biomoléculas con una elevada funcionalización, como ADN, péptidos, proteínas, oligosacáridos y glicoconjugados, para su posterior aplicación en el estudio de sistemas biológicos. Incluso se han llegado a etiquetar entidades biológicas de mayor complejidad como son los virus, bacterias y células^{26, 48, 49}.

Medal y col¹⁰ fueron los primeros en poner de manifiesto la potencialidad de las reacciones de CuAAC en bioconjugación. Aplicaron esta química a la **síntesis en fase sólida de péptidos** y comprobaron que la reacción de CuAAC es totalmente compatible con este tipo de química y con los grupos protectores que en ella se utilizan.

La unión de etiquetas o sondas, como fluoróforos o biotina, a moléculas de ADN presenta una gran importancia en técnicas de diagnóstico⁵⁰, secuenciación y aplicaciones nanotecnológicas⁵¹. Ju y col.⁵² publicaron el primer ejemplo de

48. Link, A. J.; Tirrell, D. A., Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (37), 11164-11165.

49. Link, A. J.; Vink, M. K. S.; Tirrell, D. A., Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (34), 10598-10602.

50. Hammond, D. M.; Manetto, A.; Gierlich, J.; Azov, V. A.; Gramlich, P. M. E.; Burley, G. A.; Maul, M.; Carell, T., DNA photography: An ultrasensitive DNA-detection method based on photographic techniques. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, (22), 4184-4187.

51. Gu, Q.; Cheng, C. D.; Gonela, R.; Suryanarayanan, S.; Anabathula, S.; Dai, K.; Haynie, D. T., DNA nanowire fabrication. *Nanotechnology* **2006**, 17, (1), R14-R25.

52. Seo, T. S.; Li, Z. M.; Ruparel, H.; Ju, J. Y., Click chemistry to construct fluorescent oligonucleotides for DNA sequencing. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, 68, (2), 609-612.

Capítulo 1

oligonucleótidos funcionalizados con un fluoróforo a través de reacciones de cicloadición de azidas y alquinos, aunque en este caso no hicieron uso de la catálisis con Cu(I). Sin embargo, Carrell y col.^{53, 54} sí que han empleado las reacciones de CuAAC para modificar oligonucleótidos y cadenas de ADN. Sintetizaron los oligonucleótidos o las cadenas de ADN a través métodos estándar e incorporaron unidades de uridina modificadas con alquinos terminales (**7** ó **8**). A continuación, y mediante el empleo de azido derivados adecuados (**figura 1.3.**), introdujeron en la cadena de ADN fluoróforos, como la cumarina (**10**) o la fluoresceína (**11**), biotina (**12**) o azúcares (**9**). El azido azúcar **9**, tras su oxidación con NaIO_4 , genera grupos aldehído que se utilizan para la tinción selectiva con plata. Estos autores observaron que las condiciones estándar de catálisis conducían a la degradación del ADN. Sin embargo, el empleo del compuesto **1** (tris (benciltriazolilmetil)-amina) como ligando evita los daños en la cadena de ADN. Recientemente han descrito un protocolo que permite llevar a cabo la incorporación de diferentes sondas dentro de la misma cadena de ADN⁵⁵.

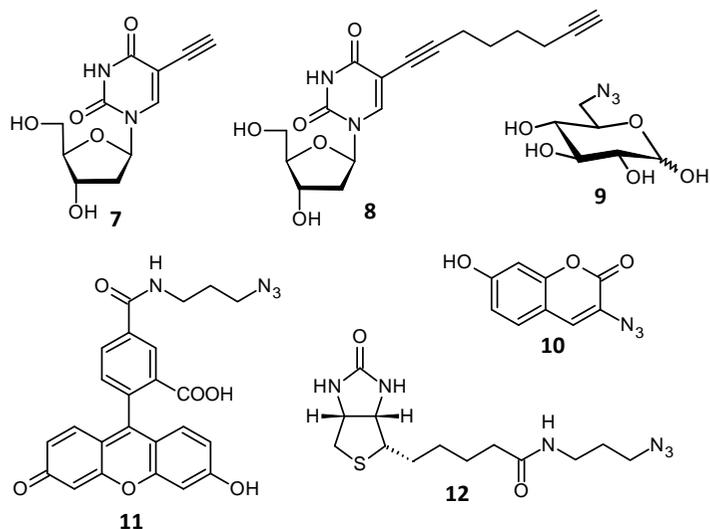


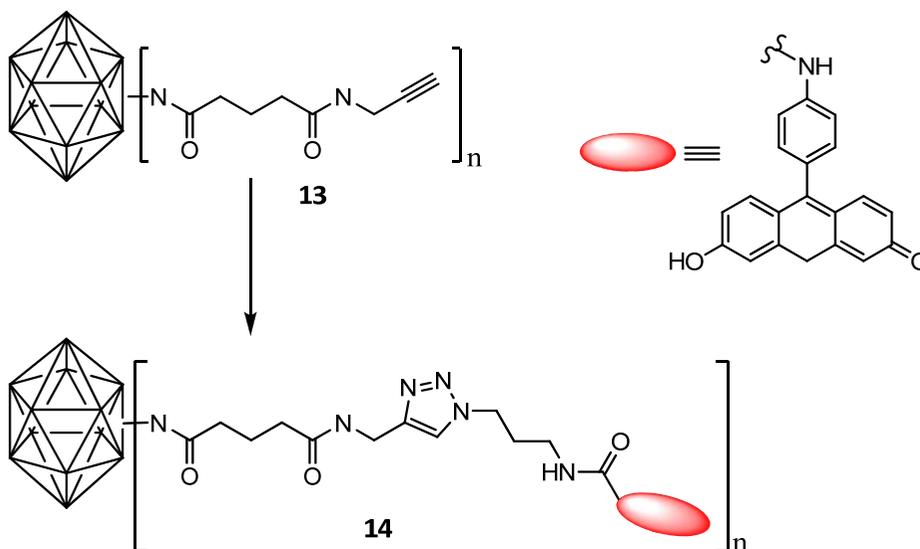
Figura 1.3. Uridina modificada con grupos alquino (**7** y **8**) y azido-derivados utilizados en la funcionalización de ADN modificado con grupos alquino.

53. Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T., Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA. *Organic Letters* **2006**, 8, (17), 3639-3642.

54. Burley, G. A.; Gierlich, J.; Mofid, M. R.; Nir, H.; Tal, S.; Eichen, Y.; Carell, T., Directed DNA metallization. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (5), 1398-1399.

55. Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T., Click-click-click: Single to triple modification of DNA. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, 47, (18), 3442-3444.

Finn y col.⁵⁶ investigaron la modificación superficial de la **cápside del virus** del mosaico del caupi (CPMV) con fluoresceína mediante el empleo de las reacciones de CuAAC (**esquema 1.3.**). Esta cápside está constituida por 60 unidades asimétricas formadas por dos proteínas, en cuyo interior se encuentra la información genética del virus. Cada unidad contiene residuos de lisina y cisteína que se utilizaron para introducir los grupos azido y alquino a través de métodos de bioconjugación tradicionales (formación de enlaces amida y tioéteres). En este trabajo observaron que el empleo de ascorbato o p-hidroquinona, como agentes reductores, conduce a la disociación de la cápside y además, aunque CPMV es estable en presencia de Cu(II) y Cu(I), en las condiciones de reacción se produce su disociación. Al igual que ocurría en el caso del ADN, estos procesos se evitan mediante el empleo del compuesto **1**. Estos mismos autores han mejorado esta metodología mediante la utilización del ligando **3** y con esta nueva estrategia han decorado la cápside con oligosacáridos, péptidos y la proteína transferrina.



Esquema 1.3. Tampón TRIS (0.1M, pH 8), $[(\text{Cu}(\text{MeCN})_4)(\text{OTf})]$, ligando **1**.

56. Sen Gupta, S.; Kuzelka, J.; Singh, P.; Lewis, W. G.; Manchester, M.; Finn, M. G., Accelerated bioorthogonal conjugation: A practical method for the Ligation of diverse functional molecules to a polyvalent virus scaffold. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, 16, (6), 1572-1579.

Capítulo 1

Las reacciones de CuAAC también se han utilizado para llevar a cabo **pegilaciones**⁵⁷, técnica que se utiliza frecuentemente para aumentar la estabilidad y la solubilidad de biomoléculas, **biotinizaciones**⁴⁸, de gran interés debido a sus aplicaciones biotecnológicas, y también para la **unión de lípidos**⁵⁸ a **proteínas**. Además, el grupo de Schult y Tirrell^{25,49,59} ha hecho uso, en multitud de ocasiones, de técnicas de mutagénesis dirigida para introducir en proteínas aminoácidos no naturales con la función azida, como por ejemplo azidonorvalina (**15**), p-azidofenilalanina (**16**) o azidonorleucina (**17**), lo que les ha permitido llevar a cabo funcionalizaciones en posiciones concretas a través de reacciones de CuAAC.

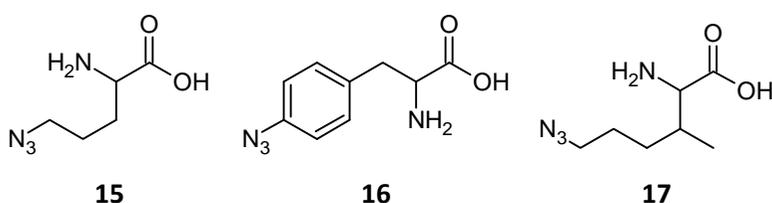


Figura 1.4. Azido derivados de aminoácidos utilizados en mutagénesis dirigida.

Otra de las aplicaciones que han encontrado las reacciones de CuAAC ha sido la **unión y la decoración de péptidos y proteínas**. Eichler y col⁶⁰. han utilizado esta reacción para la unión de dos fragmentos peptídicos entre sí, así como para la unión de péptidos sobre un andamio multivalente. Por ejemplo, han sido capaces de unir secuencialmente tres péptidos derivatizados con un grupo azida a un péptido cíclico. Para ello incorporaron tres grupos protectores ortogonales en tres puntos diferentes del péptido, se llevó a cabo la desprotección selectiva y la incorporación de un alquino terminal que se hizo reaccionar con el correspondiente

57. Deiters, A.; Cropp, T. A.; Summerer, D.; Mukherji, M.; Schultz, P. G., Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, (23), 5743-5745.

58. Musiol, H. J.; Dong, S. L.; Kaiser, M.; Bausinger, R.; Zurnbusch, A.; Bertsch, U.; Moroder, L., Toward semisynthetic lipoproteins by convergent strategies based on click and Ligation chemistry. *Chembiochem* **2005**, *6*, (4), 625-628.

59. Dieterich, D. C.; Link, A. J.; Graumann, J.; Tirrell, D. A.; Schuman, E. M., Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, (25), 9482-9487.

60. Franke, R.; Doll, C.; Eichler, J., Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, (26), 4479-4482.

azido-péptido, dando lugar a la estructura **18**. Esta estrategia presenta un gran potencial para el desarrollo de librerías de proteínas

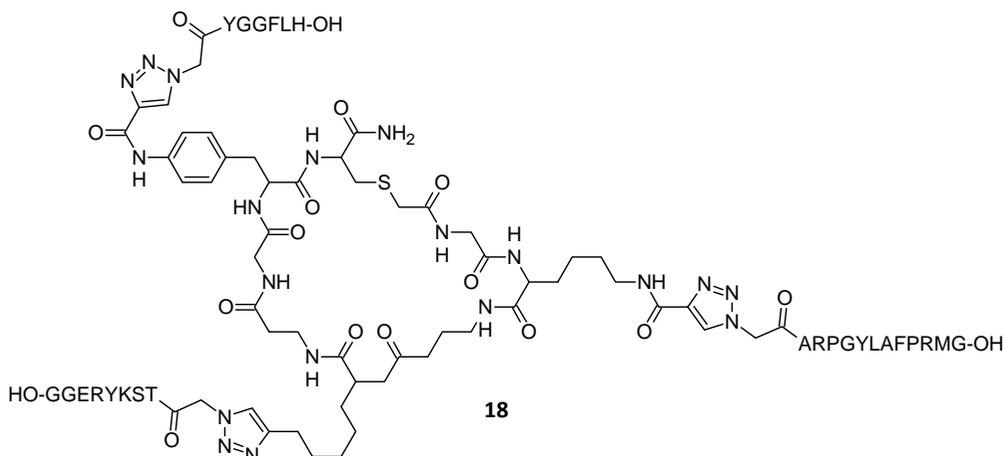
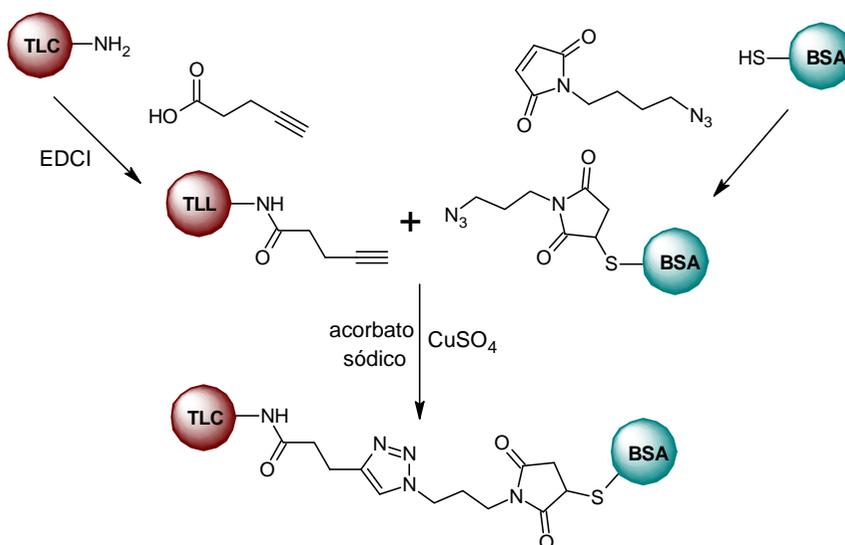


Figura 1.5. Péptido cíclico funcionalizado con diferentes péptidos mediante CuAAC.

Las reacciones de CuAAC también han permitido llevar a cabo **uniones proteína-proteína**. Nolte y Rowan⁶¹ obtuvieron un heterodímero de TLL (“*Thermomyces Lanuginosa Lipase*”) y de BSA (“*Bovine Serum Albumin*”) a través de reacciones de CuAAC. La BSA se utiliza para incrementar la adsorción de la lipasa sobre una superficie, y así poder llevar a cabo estudios enzimáticos, y, además, evita que se produzcan adsorciones inespecíficas. La metodología que utilizaron se describe en el **esquema 1.4**. Tras tres días de reacción con CuSO₄/ascorbato sódico como catalizador obtuvieron el heterodímero TLL-BSA con un rendimiento del 80%. Con este heterodímero no sólo se mejoraron las propiedades de adsorción sino que, además, se observó un aumento en la actividad catalítica con respecto a la lipasa no funcionalizada.

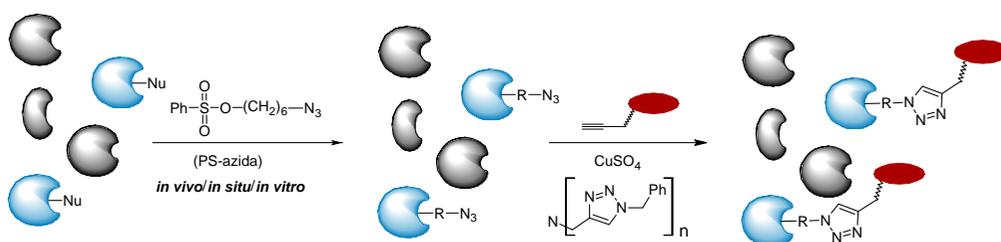
61. Hatzakis, N. S.; Engelkamp, H.; Velonia, K.; Hofkens, J.; Christianen, P. C. M.; Svendsen, A.; Patkar, S. A.; Vind, J.; Maan, J. C.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M., Synthesis and single enzyme activity of a clicked lipase-BSA hetero-dimer. *Chemical Communications* **2006**, (19), 2012-2014.



Esquema 1.4. Síntesis del heterodímero TLL-BSA mediante CuAAC.

Uno de los grandes retos de la biología es comprender la función y la regulación de las proteínas en su medio natural. Un método que se utiliza para el análisis funcional de enzimas en proteomas complejos ha sido el **ABPP** (“*Activity-Based Protein Profiling*”). ABPP es una técnica que utiliza una sonda dirigida que es capaz de unirse covalentemente a la forma activa de un enzima pero no a su forma inhibida o a sus precursores inactivos. Las sondas que se utilizan contienen dos elementos clave: un grupo reactivo que se une de forma covalente y específica al sitio activo del enzima y una etiqueta, como biotina o un fluoróforo, que sirve para detectar o aislar la enzima marcada. Esta metodología requiere la homogeneización celular antes de llevar a cabo el análisis, lo que implica una gran pérdida de información. Una posible solución sería la realización de este tipo de análisis *in vivo*, sin embargo, las sondas suelen tener un tamaño demasiado grande lo que limita su permeabilidad y distribución celular. Cravatt y col.²⁷ resolvieron este problema mediante el empleo de reactivos de pequeño tamaño permeables a la célula y derivatizados con grupos azida, lo que permite su posterior etiquetado mediante reacciones de CuAAC con etiquetas funcionalizadas con grupos alquino. En un primer trabajo compararon el éster fenilsulfonato de la rodamina (PS-rodamina) con su análogo funcionalizado con un grupo azida, el cual puede ser posteriormente etiquetado mediante una reacción de CuAAC. Es conocida la capacidad de PS-rodamina para etiquetar el centro activo de algunas enzimas, entre ellas la GST, por lo que para demostrar su hipótesis trataron una alícuota de

lisado con PS-rodamina y otra con PS-azida seguido de una reacción de cicloadición con alquino-rodamina (**esquema 1.5.**). El resultado fue que con la mayor parte de las proteínas obtuvieron señales similares con ambas sondas, únicamente en algunos casos observaron señales de fluorescencia más intensas al trabajar con PS-azida. Tras estos resultados comprobaron que la PS-azida también era eficaz con células vivas (*in situ*), incluso llevaron a cabo análisis de actividades enzimáticas *in vivo* haciendo uso de esta metodología en dos pasos CuAAC-ABPP (**esquema 1.5.**). Estos resultados ponen de manifiesto la potencialidad de las reacciones de CuAAC para llevar a cabo experimentos de ABPP en células vivas y en animales.



Esquema 1.5. Empleo de las reacciones de CuAAC en ensayos ABPP.

Este tipo de ensayos también se han realizado mediante **reacciones de cicloadición libres de Cu(I)**. Las reacciones de CuAAC son más rápidas y permiten obtener una mayor sensibilidad. Sin embargo, estas reacciones no pueden llevarse a cabo en células o animales vivos, debido a la toxicidad del Cu, hecho que no ocurre con las reacciones de cicloadición libres de Cu(I).

1.2.2.3. Inmovilización de biomoléculas.

La inmovilización de biomoléculas sobre soportes sólidos con retención de su actividad es una técnica que cada día presenta más aplicaciones para el desarrollo de “*microarrays*”, “*microbeads*” y biosensores, así como en cromatografía de afinidad. En términos generales, esta inmovilización puede llevarse a cabo siguiendo dos estrategias diferentes: mediante interacciones no-covalentes o a través de la formación de enlaces covalentes. Generalmente se prefiere esta última porque conduce a una orientación definida y uniforme de las biomoléculas. Durante los últimos años han aparecido bastantes ejemplos en

Capítulo 1

bibliografía en los que se hace uso de las reacciones de CuAAC para la **modificación de superficies sólidas**, sobre todo en la funcionalización de **monocapas autoensambladas** (SAM) con moléculas de bajo peso molecular. En este área los pioneros han sido Collman y Chidsey cuyo trabajo se ha centrado en la funcionalización de superficies de oro⁶²⁻⁶⁵ y ha sido aplicado, por otros grupos a diferentes materiales, como silicón^{66,67}, grafito^{68,69}, sílica^{70,71} y vidrio⁷². Además, esta metodología ya ha sido empleada para la inmovilización de una gran variedad de moléculas, sintéticas o biológicas, de diversa naturaleza, como por ejemplo:

- ✓ Biotina⁷³
- ✓ Nucleósidos⁷⁴

62. Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Chidsey, C. E. D., "Clicking" functionality onto electrode surfaces. *Langmuir* **2004**, *20*, (4), 1051-1053.

63. Collman, J. P.; Devaraj, N. K.; Eberspacher, T. P. A.; Chidsey, C. E. D., Mixed azide-terminated monolayers: A platform for modifying electrode surfaces. *Langmuir* **2006**, *22*, (6), 2457-2464.

64. Devaraj, N. K.; Miller, G. P.; Ebina, W.; Kakaradov, B.; Collman, J. P.; Kool, E. T.; Chidsey, C. E. D., Chemoselective covalent coupling of oligonucleotide probes to self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (24), 8600-8601.

65. Decreau, R. A.; Collman, J. P.; Yang, Y.; Yan, Y. L.; Devaraj, N. K., Syntheses of hemoprotein models that can be covalently attached onto electrode surfaces by click chemistry. *Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, (8), 2794-2802.

66. Rohde, R. D.; Agnew, H. D.; Yeo, W. S.; Bailey, R. C.; Heath, J. R., A non-oxidative approach toward chemically and electrochemically functionalizing Si(111). *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (29), 9518-9525.

67. Ciampi, S.; Bocking, T.; Kilian, K. A.; James, M.; Harper, J. B.; Gooding, J. J., Functionalization of acetylene-terminated monolayers on Si(100) surfaces: A click chemistry approach. *Langmuir* **2007**, *23*, (18), 9320-9329.

68. Li, H. M.; Cheng, F. O.; Duft, A. M.; Adronov, A., Functionalization of single-walled carbon nanotubes with well-defined polystyrene by "click" coupling. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, (41), 14518-14524.

69. Devadoss, A.; Chidsey, C. E. D., Azide-modified graphitic surfaces for covalent attachment of alkyne-terminated molecules by "click" chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, (17), 5370.

70. Ortega-Munoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of glyco-silicas by Cu(I)-catalyzed "click-chemistry" and their applications in affinity chromatography. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, (16-17), 2410-2420.

71. Guo, Z. M.; Lei, A. W.; Zhang, Y. P.; Xu, Q.; Xue, X. Y.; Zhang, F. F.; Liang, X. M., "Click saccharides": novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chemical Communications* **2007**, (24), 2491-2493.

72. Sun, X. L.; Stabler, C. L.; Cazalis, C. S.; Chaikof, E. L., Carbohydrate and protein immobilization onto solid surfaces by sequential Diels-Alder and azide-alkyne cycloadditions. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, (1), 52-57.

73. Nandivada, H.; Chen, H. Y.; Bondarenko, L.; Lahann, J., Reactive polymer coatings that "click". *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, (20), 3360-3363.

74. Lee, J. K.; Chi, Y. S.; Choi, I. S., Reactivity of acetylenyl-terminated self-assembled monolayers on gold: Triazole formation. *Langmuir* **2004**, *20*, (10), 3844-3847.

- ✓ Oligonucleótidos⁷⁵
- ✓ Carbohidratos⁷⁶
- ✓ Porfirinas⁷⁷
- ✓ Proteínas⁷⁸.

De los diferentes materiales que han sido derivatizados y funcionalizados a través de reacciones de CuAAC cabe destacar las **nanopartículas magnéticas**, las cuales presentan un gran interés debido a sus aplicaciones en diagnóstico y bioseparación⁷⁹. Weissleder y col.⁸⁰ llevaron a cabo la funcionalización de nanopartículas magnéticas con una cubierta de dextrano a través de reacciones de CuAAC. Las unidades de azúcar del dextrano se hicieron reaccionar con 3-azido propilamina y con propargilamina para la obtención de azido- y alquino-nanopartículas. A través de reacciones de CuAAC se inmovilizaron una serie de moléculas de interés, como la biotina, fluoróforos (indocianina, fluoresceína), esteroides (oestrógeno) y fármacos (paclitaxel). Recientemente, Lin y col.⁸¹ han descrito una metodología para la funcionalización de nanopartículas magnéticas recubiertas de sílica con grupos azido y alquino que usaron para la unión de biotina, péptidos y proteínas.

75. Chevolut, Y.; Bouillon, C.; Vidal, S.; Morvan, F.; Meyer, A.; Cloarec, J. P.; Jochum, A.; Praly, J. P.; Vasseur, J. J.; Souteyrand, E., DNA-based carbohydrate biochips: A platform for surface glyco-engineering. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, (14), 2398-2402.

76. Zhang, Y.; Luo, S. Z.; Tang, Y. J.; Yu, L.; Hou, K. Y.; Cheng, J. P.; Zeng, X. Q.; Wang, P. G., Carbohydrate-protein interactions by "clicked" carbohydrate self-assembled monolayers. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (6), 2001-2008.

77. Devaraj, N. K.; Decreau, R. A.; Ebina, W.; Collman, J. P.; Chidsey, C. E. D., Rate of interfacial electron transfer through the 1,2,3-triazole linkage. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, (32), 15955-15962.

78. Lin, P. C.; Ueng, S. H.; Tseng, M. C.; Ko, J. L.; Huang, K. T.; Yu, S. C.; Adak, A. K.; Chen, Y. J.; Lin, C. C., Site-specific protein modification through Cu-I-catalyzed 1,2,3-triazole formation and its implementation in protein microarray fabrication. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (26), 4286-4290.

79. Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schuth, F., Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, (8), 1222-1244.

80. Sun, E. Y.; Josephson, L.; Weissleder, R., "Clickable" nanoparticles for targeted imaging. *Molecular Imaging* **2006**, 5, (2), 122-128.

81. Lin, P. C.; Ueng, S. H.; Yu, S. C.; Jan, M. D.; Adak, A. K.; Yu, C. C.; Lin, C. C., Surface modification of magnetic nanoparticle via Cu(I)-Catalyzed alkyne-azide [2+3] cycloaddition. *Organic Letters* **2007**, 9, (11), 2131-2134.

La **tecnología "array"** tiene como objetivo la disposición de biomoléculas sobre superficies con el fin de estudiar sus interacciones biológicas. Los **"microarrays"** tienen un gran interés en investigación, en el diagnóstico de enfermedades y en el desarrollo de nuevos fármacos y, como ya se ha comentado, han sido uno de los beneficiados por el desarrollo de las reacciones de CuAAC. Por ejemplo, Chaikof y col.⁷² utilizaron una superficie de vidrio derivatizada con alquinos terminales para la unión de azido-derivados de distinta naturaleza y con distintas propiedades de reconocimiento. En concreto utilizaron biotina, lactosa y trombomodulina, todas ellas convenientemente derivatizadas con un grupo azida. Una vez llevada a cabo la inmovilización pusieron esta superficie en contacto con las correspondientes proteínas marcadas con FITC (isotiocianato de fluoresceína), es decir, estreptavidina para la superficie biotinilada, una lectina para la lactosa y una proteína que se une de manera específica al extremo N-terminal de la trombomodulina, y en todos los casos las proteínas eran capaces de reconocer a sus ligandos inmovilizados (**figura 1.6.**).

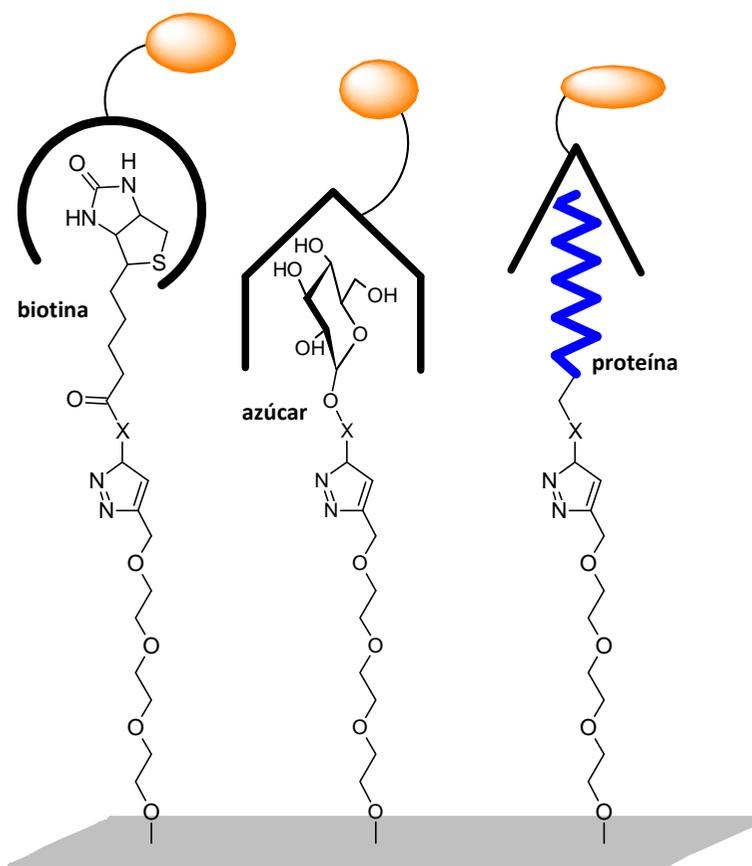


Figura 1.6. Inmovilización de biotina, carbohidratos y proteínas mediante CuAAC.

Estos resultados demuestran el gran potencial que tienen las reacciones de CuAAC para la obtención de “glicoarrrays”⁸² y “arrrays” de proteínas⁷⁸, sin la generación de subproductos, así como la posibilidad de utilizar este protocolo para inmovilizar otro tipo de sustancias sobre superficies sólidas sin pérdida de actividad. Mediante el empleo de esta química también se han desarrollado “microarrrays” de ADN⁶⁴.

Otra de las aplicaciones de la inmovilización de biomoléculas mediante CuAAC es la **cromatografía de afinidad**, la cual explota las interacciones existentes entre ciertas moléculas biológicas, como antígeno-anticuerpo, carbohidrato-lectina o enzima-substrato, para analizar o purificar mezclas de biomoléculas. El grupo de Santoyo-González y col.⁷⁰ ha desarrollado un procedimiento rápido y eficiente para la inmovilización de carbohidratos sobre gel de sílice previamente funcionalizado con grupos azida y alquino a través de procesos de silanización. Mediante el empleo de reacciones de CuAAC llevaron a cabo la inmovilizaron de una serie de estructuras dendríticas y monoméricas constituidas por unidades de α -D-manopiranosidos que les permitió la obtención de una serie de materiales que denominaron “glicosílicas” (**figura 1.7.**). Para evaluar la potencialidad de los materiales obtenidos como soportes en cromatografía de afinidad llevaron a cabo la purificación y aislamiento de la lectina ConA (Concanavalina A), a partir de un extracto crudo de proteínas de raíces de plantas y de un lisado de *Escherichia coli* al que añadieron ConA.

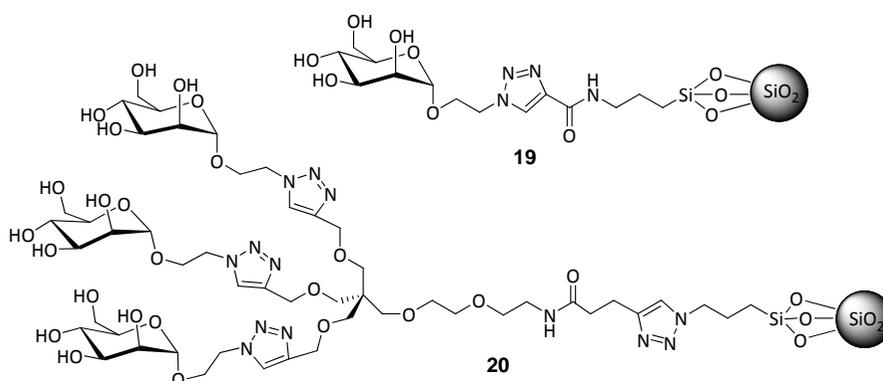


Figura 1.7. Glicosílicas sintetizadas por el grupo de Santoyo-González.

82. Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C. H., Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (48), 14397-14402.

Capítulo 1

Haciendo uso de esta misma metodología llevaron a cabo la inmovilización de biotina sobre azido-sílica⁸³, poniendo de manifiesto nuevamente la versatilidad de las reacciones de CuAAC. Este nuevo material sintetizado presenta importantes aplicaciones en proteómica: permite la purificación de avidina de la clara de huevo en condiciones similares a las columnas de iminobiotina y, además, el aislamiento y purificación de proteínas biotiniladas *in vitro*.

1.2.2.4. Ciencias de los materiales.

Las principales características de las reacciones de CuAAC que las hacen ideales para su empleo en ciencias de los materiales son su elevada eficiencia y la facilidad de su procesado. Los **hidrogeles** son materiales que presentan un gran interés ya que pueden ser utilizados en la liberación controlada de fármacos, en ingeniería de tejidos y como fase estacionaria en cromatografía de afinidad. Los primeros en utilizar las reacciones de CuAAC para llevar a cabo la síntesis de hidrogeles fueron Hilborn y col.⁸⁴. Utilizaron PVA (polivinil alcohol) con un peso molecular medio de 16000 que funcionalizaron, parcialmente, con grupos azido y alquino y llevaron a cabo el entrecruzamiento en agua o DMSO haciendo uso de las condiciones clásicas de catálisis, CuSO₄ y ascorbato sódico como agente reductor. Hawder y Hedrick⁸⁵ describieron la síntesis de hidrogeles de PEG (polietilenglicol) a partir de cadenas lineales de PEG de distintos pesos moleculares y funcionalizadas con grupos alquino que entrecruzaron con PEG tetrafuncionalizado con grupos azida. Estos hidrogeles mostraron una mayor capacidad para retener agua y mejores propiedades mecánicas que los hidrogeles sintetizados a través de métodos fotoquímicos. Además, la elevada quimioselectividad de las reacciones de CuAAC permite obtener estos hidrogeles en presencia de otras moléculas o biomoléculas, que quedarían atrapadas en la estructura del hidrogel, las cuales pueden interferir en otros procesos de entrecruzamiento. Recientemente Crescenzi y col.⁸⁶ sintetizaron un hidrogel de ácido hialurónico a través de reacciones de

83. Santoyo-Gonzalez, F.; Hernandez-Mateo, F.; Ortega-Muñoz, M.; Salto-Gonzalez, R.; Giron-Gonzalez, M. D.; Sevillano-Tripero, N. Biotina-soporte poroso, metodos de obtencion y usos. N. de solicitud: P200701850, **2007**.

84. Ossipov, D. A.; Hilborn, J., Poly(vinyl alcohol)-based hydrogels formed by "click chemistry". *Macromolecules* **2006**, 39, (5), 1709-1718.

85. Malkoch, M.; Vestberg, R.; Gupta, N.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Mason, A. F.; Hedrick, J. L.; Liao, Q.; Frank, C. W.; Kingsbury, K.; Hawker, C. J., Synthesis of well-defined hydrogel networks using Click chemistry. *Chemical Communications* **2006**, (26), 2774-2776.

86. Crescenzi, V.; Cornelio, L.; Di Meo, C.; Nardecchia, S.; Lamanna, R., Novel hydrogels via click chemistry: Synthesis and potential biomedical applications. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (6), 1844-1850.

CuAAC. Estos materiales presentan un gran interés debido a sus aplicaciones médicas y terapéuticas, de hecho estos autores pusieron de manifiesto que este material permite la liberación controlada de doxorubicina así como el atrapamiento de células de levadura.

La elevada eficiencia de las reacciones de CuAAC también ha sido empleada en la síntesis de **dendrimeros** que son moléculas sintéticas que se encuentran regularmente ramificadas y que por sus propiedades y aplicaciones tienen un gran interés. Tras más de 25 años su síntesis aún presenta problemas, sobre todo en la etapa de purificación, ya que en muchas ocasiones son necesarias tediosas purificaciones cromatográficas. Estos problemas se han superado, en cierta medida, gracias a la elevada eficiencia de las reacciones de CuAAC. Esta reacción requiere únicamente cantidades estequiométricas de los reactivos y las reacciones son prácticamente cuantitativas, lo que simplifica enormemente la etapa de purificación. Los pioneros en el empleo de las reacciones de CuAAC para llevar a cabo la síntesis de dendrimeros fueron Fokin y col.²¹ A través de una metodología convergente sintetizaron una serie de dendrimeros como el que aparece en la **figura 1.8**.

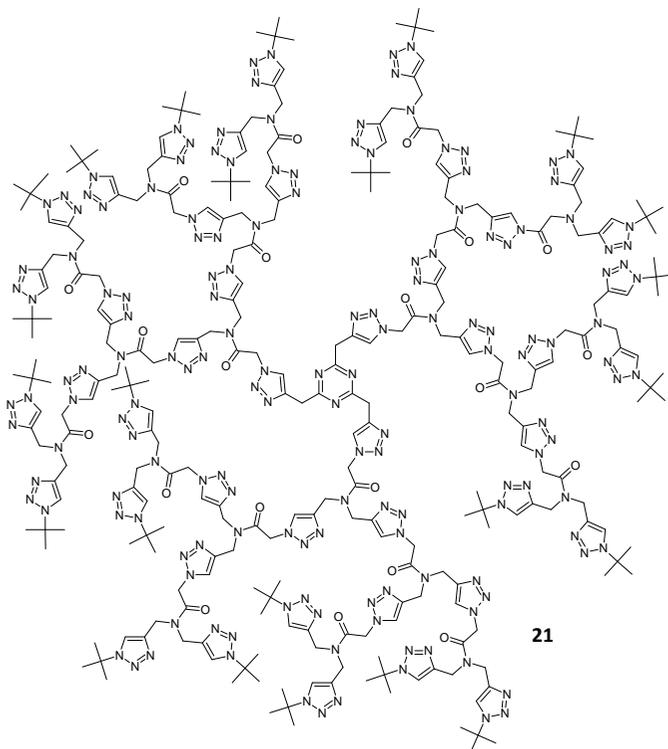
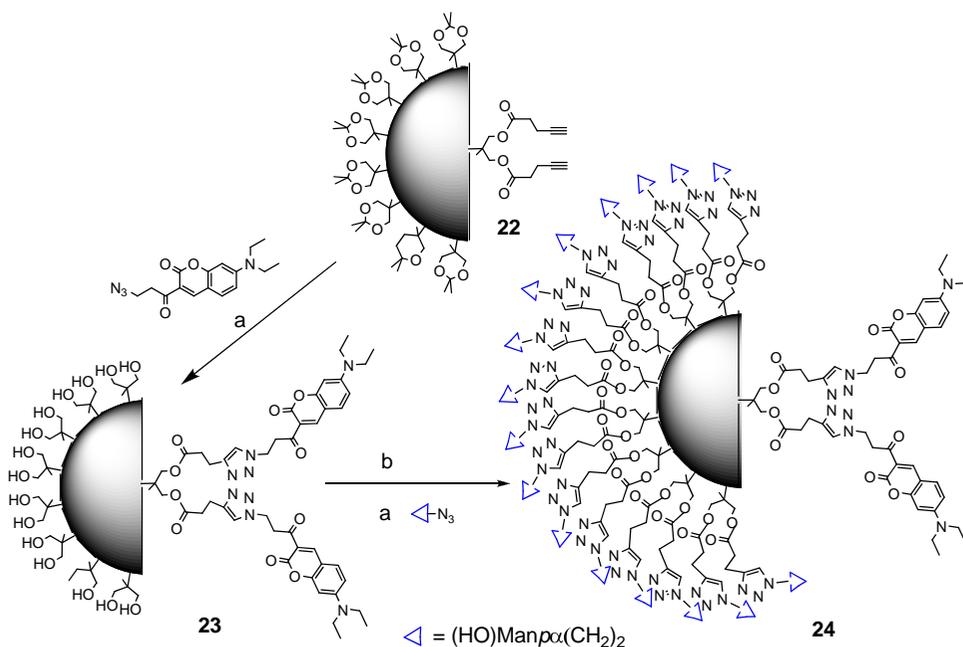


Figura 1.8. Dendrimer sintetizado mediante una metodología convergente y CuAAC.

Capítulo 1

La potencialidad de esta reacción como herramienta para la obtención de **glicodendrimeros** ha sido puesta de manifiesto por Wu y col.⁸⁷ quienes recientemente han llevado a cabo la síntesis de dendrimeros de manosa no simétricos con unidades de cumarina (**esquema 1.6**). Estos productos, por su naturaleza dual, son potencialmente útiles en la identificación y tratamiento de ciertas patologías vía interacciones multivalentes. En este caso las reacciones de CuAAC se han utilizado para decorar los dendrimeros y no para llevar a cabo la síntesis de los mismos. Otros autores que también han hecho uso de las reacciones de CuAAC para introducir carbohidratos en dendrimeros funcionalizados han sido Liskamp⁸⁸ y Riguera⁸⁹.



Esquema 1.6. (a) 1. DOWEX, MeOH 2. derivado azido de la cumarina, CuSO_4 /Ascorbato sódico, THF/ H_2O ; (b) 1. $(\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO})_2\text{O}$, DMAP/Py 2. azido azúcar, CuSO_4 /Ascorbato sódico, THF/ H_2O .

87. Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J., Multivalent, bifunctional dendrimers prepared by click chemistry. *Chemical Communications* **2005**, (46), 5775-5777.

88. Joosten, J. A. F.; Tholen, N. T. H.; El Maate, F. A.; Brouwer, A. J.; van Esse, G. W.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J.; Pieters, R. J., High-yielding microwave-assisted synthesis of triazole-linked glycodendrimers by copper-catalyzed [3+2] cycloaddition. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, 3182-3185.

89. Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Rodriguez-Meizoso, I.; Riguera, R., A click approach to unprotected glycodendrimers. *Macromolecules* **2006**, 39, (6), 2113-2120.

Sin embargo, Ortega-Muñoz⁹⁰ ha utilizado las reacciones de CuAAC tanto para la unión de las unidades de azúcar como para las síntesis de la estructura dendrítica. Ha desarrollado una nueva metodología para la síntesis convergente de glicodendrimeros basados en pentaeritritol mediante CuAAC que, además, le ha permitido obtener dendrimeros heterogéneos mediante la unión de dendrones con unidades de azúcar diferentes así como dendrimeros con un núcleo fluorescente (**figura 1.9.**) que permite su seguimiento mediante fluorescencia.

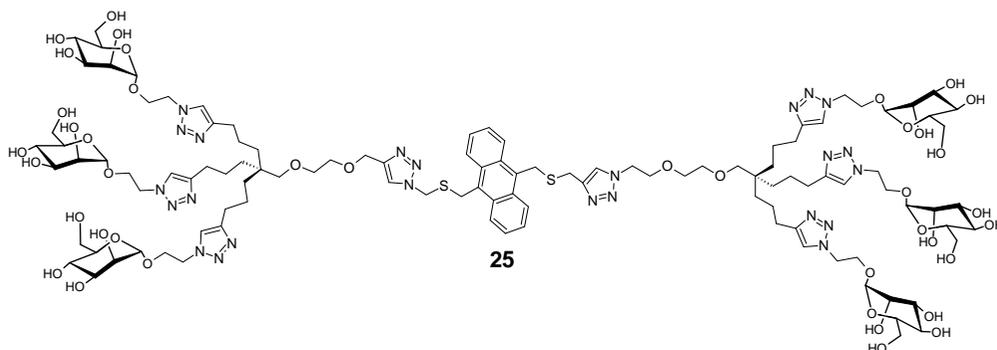


Figura 1.9. Dendrimero de manosa con núcleo fluorescente.

Los sistemas **péptidicos dendriméricos** pueden ser útiles en la preparación de vacunas sintéticas o en el diagnóstico y tratamiento de infecciones donde, a través de la multivalencia, se puede conseguir que la actividad biológica de estos sistemas aumente considerablemente. Liskamp y col.⁹¹ han llevado a cabo la síntesis de péptidos dendriméricos di-, tetra-, octa- y hasta hexadecavalentes a través de reacciones de CuAAC. Hicieron uso de MW lo que les permitió reducir considerablemente los tiempos de reacción. No sólo trabajaron con péptidos de pequeño tamaño, sino que también obtuvieron muy buenos resultados con péptidos de mayor tamaño no protegidos y con interés biológico y con péptidos cíclicos. En todos los casos trabajaron con azido-derivados de los péptidos y con estructuras dendriméricas decoradas con alquinos terminales (**figura 1.10.**).

90. Ortega-Muñoz, M. Síntesis de sistemas multivalentes conteniendo azúcares e inmovilización de biomoléculas mediante “click chemistry”. Universidad de Granada, **2007**.

91. Rijkers, D. T. S.; van Esse, G. W.; Merx, R.; Brouwer, A. J.; Jacobs, H. J. F.; Pieters, R. J.; Liskamp, R. M. J., Efficient microwave-assisted synthesis of multivalent dendrimeric peptides using cycloaddition reaction (click) chemistry. *Chemical Communications* **2005**, (36), 4581-4583.

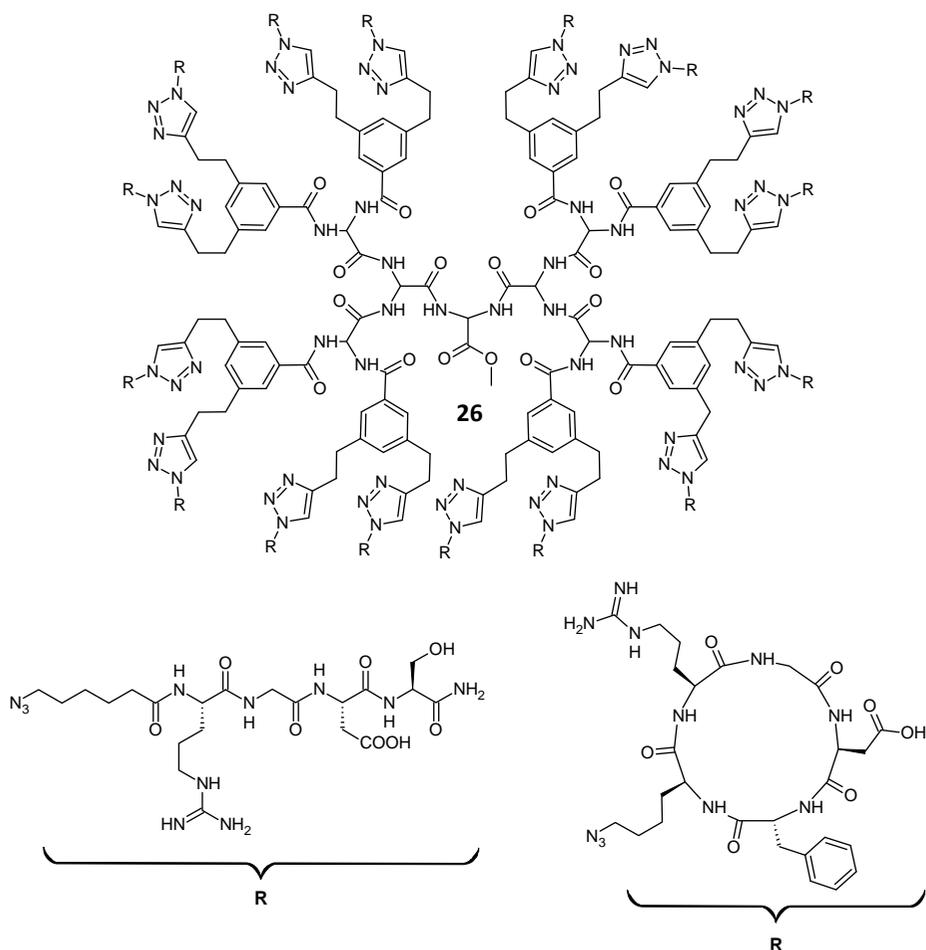


Figura 1.10. Estructura de diversos sistemas péptidos dendriméricos.

En las últimas décadas se han explorado distintas arquitecturas poliméricas ya que las propiedades de los **polímeros** se encuentran íntimamente relacionadas con su estructura molecular. Uno de los objetivos en la síntesis de polímeros ha sido la obtención de **estructuras poliméricas macrocíclicas** ya que presentan gran interés debido a sus propiedades topológicas y físicas. Aunque se han utilizado distintas metodologías, casi todas proporcionan bajos rendimientos y procesos competitivos que implican tediosos procesos de purificación para obtener el producto. Grayson y col.⁹² hicieron uso de las reacciones de CuAAC para evitar todos estos inconvenientes. Introdujeron grupos azido y alquino en los extremos de un poliestireno lineal y lo adicionaron de forma continua sobre una disolución de Cu(I), lo que les llevó a la obtención del polímero cíclico **27**.

92. Laurent, B. A.; Grayson, S. M., An efficient route to well-defined macrocyclic polymers via "click" cyclization. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (13), 4238-4239.

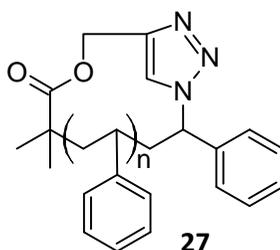
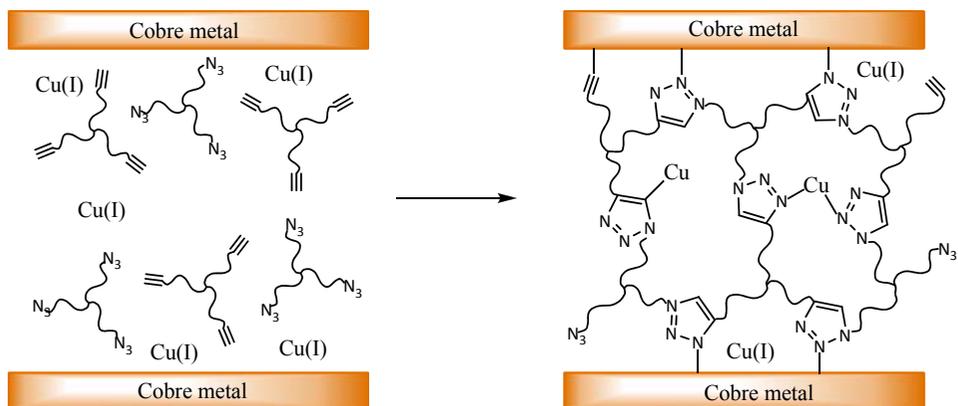


Figura 1.11. Polímero cíclico obtenido mediante CuAAC.

Impulsados por el potencial de las reacciones de CuAAC en la síntesis de dendrímeros a partir de andamios polivalentes Finn y col.⁹³ desarrollaron un nuevo tipo de polímeros que sintetizaron a partir de azidas y alquinos di-, tri- y tetravalentes que presentaban la capacidad de actuar como **adhesivo de metales** e incluso de plástico y cristal, superando incluso a los pegamentos comerciales. Realizaron la síntesis del polímero sobre una superficie de cobre para lo cual depositaron una disolución concentrada de los monómeros sobre la superficie de dos placas de cobre, las unieron entre sí en unas determinadas condiciones de presión y temperatura y evaporaron el disolvente (**esquema 1.7**). El cobre de las placas ejerce dos funciones: fuente de Cu(I) para la catálisis de la reacción y, además, a través de las interacciones con los anillos de triazol une el polímero a la superficie metálica. Como los politriazoles son capaces de unirse a distintos tipos de metales esta metodología se probó con láminas de zinc en lugar de cobre. En este caso a la disolución de los monómeros se le adicionó Cu(I). La capacidad de actuar como adhesivo era similar a la que presentan pegamentos comerciales y estaba en el rango de la que se había conseguido con las placas de cobre.

93. Díaz, D. D.; Punna, S.; Holzer, P.; McPherson, A. K.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Finn, M. G., Click chemistry in materials synthesis. 1. Adhesive polymers from copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2004**, 42, (17), 4392-4403.

Capítulo 1

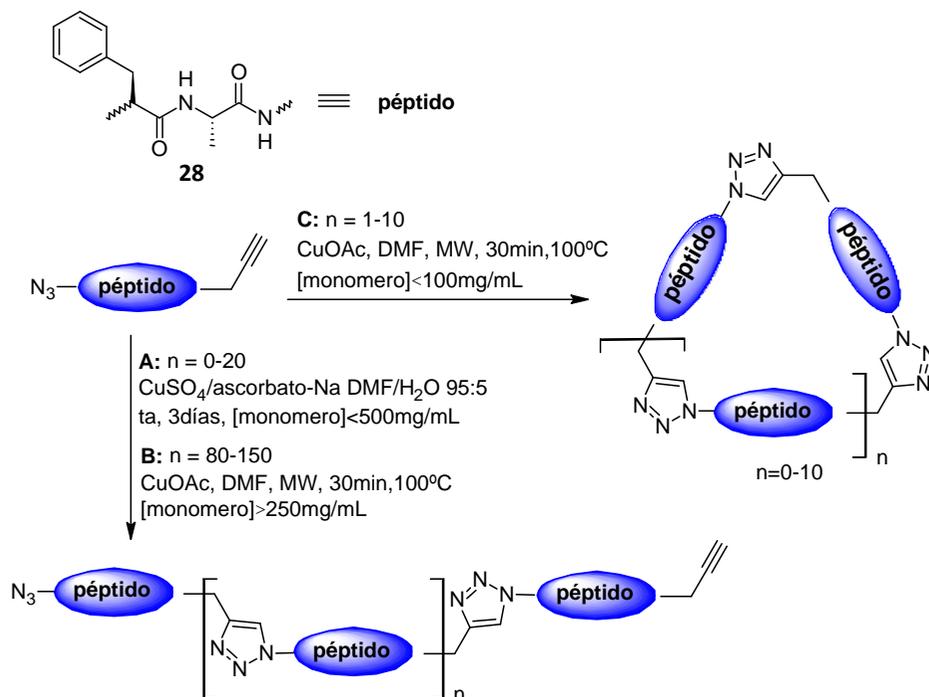


Esquema 1.7. Empleo de las reacciones de CuAAC como adhesivo.

Existe un gran interés en el desarrollo de **polímeros peptídicos** ya que este tipo de materiales pueden ser utilizados con fines muy diversos como, por ejemplo, la liberación controlada de fármacos o su empleo en ingeniería de tejidos. La posibilidad de llevar a cabo las reacciones de cicloadición de azidas y alquinos en presencia de otros grupos funcionales y la similitud topológica que existe entre el enlace peptídico y el anillo de triazol⁹⁴ llevó a Liskamp y col.⁹⁵ a emplear las reacciones de CuAAC para la síntesis de polímeros peptídicos. Estos autores utilizaron como monómero el dipéptido azido-fenilalanina-alanil-propargil amida **28** el cual, en función de las condiciones de reacción, dio lugar a la obtención de polímeros lineales de alto peso molecular (de hasta 300 aminoácidos) o polímeros cíclicos de tamaño medio (4-20 aminoácidos) (**esquema 1.8.**).

⁹⁴. Brik, A.; Alexandratos, J.; Lin, Y. C.; Elder, J. H.; Olson, A. J.; Wlodawer, A.; Goodsell, D. S.; Wong, C. H., 1,2,3-triazole as a peptide surrogate in the rapid synthesis of HIV-1 protease inhibitors. *ChemBiochem* **2005**, 6, (7), 1167.

⁹⁵. van Dijk, M.; Mustafa, K.; Dechesne, A. C.; van Nostrum, C. F.; Hennink, W. E.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J., Synthesis of peptide-based polymers by microwave-assisted cycloaddition backbone polymerization. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (2), 327-330.



Esquema 1.8. Estructuras de los polímeros péptidos sintetizados por Liskamp y col. mediante CuAAC.

1.3. Vinilsulfonas.

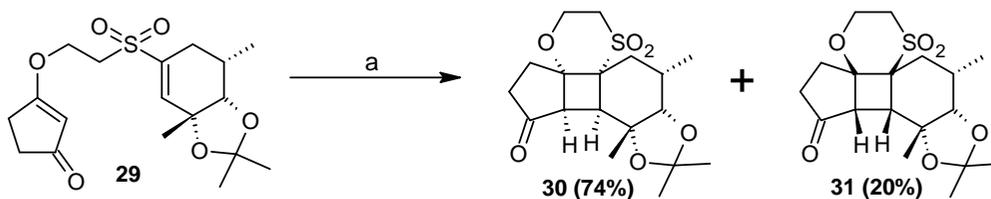
1.3.1. Generalidades y aplicaciones en síntesis.

Las sulfonas α - β insaturadas o vinilsulfonas son bien conocidas por su utilidad como intermedios en síntesis orgánica⁹⁶⁻⁹⁹. Estos compuestos han demostrado ser reactivos de síntesis muy versátiles ya que la presencia del grupo sulfona activa el doble enlace debido al efecto aceptor de electrones de la misma. Esto permite a las sulfonas α - β insaturadas actuar como aceptores de Michael en adiciones conjugadas de tipo 1,4 y en reacciones de cicloadición.

Cicloadiciones.

Las vinilsulfonas pueden intervenir en diferentes procesos de cicloadición⁹⁷, dentro de los cuales caben destacar los siguientes:

- ✓ **Cicloadiciones [2+2]:** conducen a la formación de ciclobutanonas sustituidas. Fue utilizada por Fuchs y col.¹⁰⁰ para la síntesis de intermedios de citocalasina, que es un producto fúngico que impide la polimerización de los filamentos de actina (**esquema 1.9.**).



Esquema 1.9. Condiciones (a): CH_3CN , $h\nu$ 240nm, 40min, 25°C.

96. Simpkins, N. S., The chemistry of vinyl sulfones. *Tetrahedron* **1990**, 46, (20), 6951-6984.

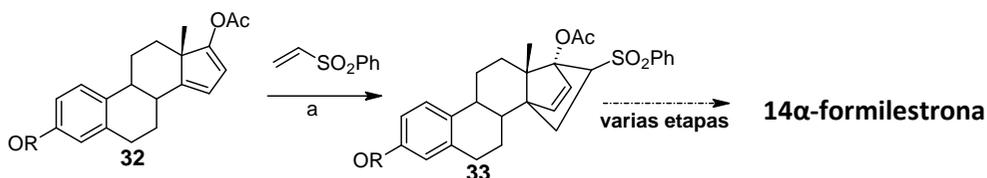
97. Delucchi, O.; Pasquato, L., The role of sulfur functionalities in activating and directing olefins in cyclo-addition reactions. *Tetrahedron* **1988**, 44, (22), 6755-6794.

98. Forristal, I., The chemistry of α,β -unsaturated sulfoxides and sulfones: an update. *Journal of Sulfur Chemistry* **2005**, 26, (2), 163-195.

99. Simpkins, N. S., *Sulfones in Organic Synthesis*. 1993; p 381 pp.

100. Musser, A. K.; Fuchs, P. L., Synthesis via vinyl sulfones .8. Cytochalasin support studies - the c14-c19 subunit of cytochalasin-c - intramolecular 2 + 2 photochemical cycloaddition of vinyl sulfones. *Journal of Organic Chemistry* **1982**, 47, (16), 3121-3131.

- ✓ **Cicloadiciones [3+2]:** las vinilsulfonas han sido utilizadas como dipolarofilos en reacciones de cicloadición 1,3-dipolares frente a azidas, óxidos de nitrilo...
- ✓ **Cicloadiciones [4+2]:** la reacción de Diels-Alder, en su versión asimétrica, es una de las herramientas más potentes en síntesis asimétrica debido a su capacidad para generar hasta 4 centros estereogénicos en un solo paso, en ocasiones con una elevada estereoselectividad. Se ha utilizado, por ejemplo, en la síntesis de la 14 α -formilestrona y otras estructuras relacionadas¹⁰¹ (**esquema1.10.**) .



Esquema 1.10. Condiciones (a): benceno, 140°C, 92%.

Reacciones de adición tipo Michael.

Las sulfonas α - β insaturadas son extremadamente útiles como aceptores de Michael¹⁰². En estas reacciones las vinilsulfonas pueden ofrecer una química complementaria a la que presentan aceptores de Michael convencionales, tales como compuestos carbonílicos α - β -insaturados. Las vinilsulfonas son especialmente interesantes en este tipo de química ya que, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos carbonílicos insaturados, la adición no puede darse sobre el grupo funcional sulfona, por lo que se evitan reacciones competitivas.

Pueden reaccionar con aminas¹⁰³, tioles¹⁰⁴ o alcoholes¹⁰⁵ dando lugar a heterosulfonas β -sustituidas. Estas reacciones transcurren mejor en solventes próticos que permiten atrapar al carbanión que se genera y, así, eliminar la

101. Bull, J. R.; Thomson, R. I., Cycloaddition route to 14- α -formylestrone and derived 14- α -substituted products. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1986**, (6), 451-453.

102. Fuchs, P. L.; Braish, T. F., Multiply convergent syntheses via conjugate-addition reactions to cycloalkenyl sulfones. *Chemical Reviews* **1986**, 86, (5), 903-917.

103. McDowell, S. T.; Stirling, C. J., Elimination-addition .12. Rates of addition of amines to alkenyl allenyl and alkynyl p-tolyl sulphones. *Journal of the Chemical Society B-Physical Organic* **1967**, (4), 351.

104. Kuroki, Y.; Lett, R., Aryl vinyl sulfones as thiol protective group. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25, (2), 197-200.

105. Auvray, P.; Knochel, P.; Normant, J. F., 5-Endo-trigonal ring closures of unsaturated sulfones. *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, (37), 4455-4458.

Capítulo 1

posibilidad de que se produzca el ataque de un electrófilo. También son capaces de reaccionar con compuestos organometálicos¹⁰⁶ o con nucleófilos carbonados más estabilizados¹⁰⁷, como los enolatos, enaminas o nitrilos, lo que da lugar a la formación de enlaces C-C, que es uno de los mayores desafíos en síntesis orgánica. Además, pueden sufrir adiciones radicalarias¹⁰⁸ que también conducen a la formación de enlaces C-C.

La química de vinilsulfonas no se limita a estos dos tipos de reacciones, sino que se ha aplicado con éxito en muchas otras reacciones, lo que demuestra la versatilidad química de este grupo funcional. Así, las vinilsulfonas pueden sufrir^{98, 109}: a) epoxidaciones, b) reducciones, c) metátesis de olefinas, d) dihidroxilación asimétrica, etc...

En todos estos procesos se mantiene la función sulfona que a su vez puede sufrir otros tipos de reacciones, entre las que cabe destacar las desulfonilaciones. En la mayoría de las aplicaciones en síntesis orgánica el grupo sulfona solamente actúa como grupo activante, su presencia no es necesaria en el producto final, de ahí que estos procesos de desulfonilación sean tan importantes.

Existen dos tipos importantes de reacciones que implican la pérdida del grupo SO₂ y la formación de un doble enlace C-C, que son:

- ✓ Reacción de olefinación de Julia¹¹⁰: consiste en la eliminación reductiva de β-hidroxisulfonas.

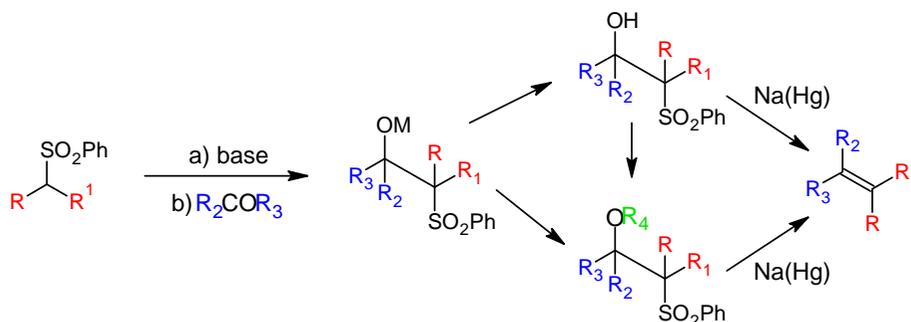
106. Posner, G. H.; Brunelle, D. J., Reaction of alpha,beta-ethylenic sulfur-compounds with organocopper reagents. *Journal of Organic Chemistry* **1973**, 38, (16), 2747-2756.

107. Hamann, P. R.; Fuchs, P. L., Syntheses via vinyl sulfones .10. Conjugate addition of moderately soft anions to a vinyl sulfone. *Journal of Organic Chemistry* **1983**, 48, (6), 914-916.

108. Matthews, D. P.; McCarthy, J. R., Addition of alpha-oxyradicals to 1-fluoro-1-(phenylsulfonyl)ethylene. *Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, (9), 2973-2975.

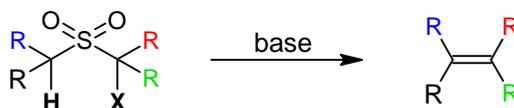
109. Meadows, D. C.; Gervay-Hague, J., Vinyl sulfones: Synthetic preparations and medicinal chemistry applications. *Medicinal Research Reviews* **2006**, 26, (6), 793-814.

110. Julia, M.; Paris, J. M., Syntheses using sulfones .5. Method for general synthesis of doubles. *Tetrahedron Letters* **1973**, (49), 4833-4836.



Esquema 1.11. Base: BuLi o LDA (M=Li) o RMgBr (M=Mg); R₄=COMe, COPh o SO₂Me.

- ✓ Reacción Ramberg-Bäcklund¹¹¹: es una reacción de transposición que sufren ciertas sulfonas con un buen grupo saliente en posición α que da lugar a la formación de un nuevo doble enlace C-C con pérdida de SO₂.



Esquema 1.12. Reacción de Ramberg-Bäcklund.

Pero también es posible eliminar el grupo SO₂ sin necesidad de que se forme un nuevo enlace C-C.

- ✓ Desulfonilación reductiva¹¹² (RSO₂R' → RH).
- ✓ Desulfonilación alquilante¹¹³ (RSO₂R' → R-R'').

En lo que respecta a los procesos de obtención, las vinilsulfonas son fáciles de preparar^{114, 115}, a través de una amplia variedad de procesos sintéticos, y de manipular, lo que ha hecho que constituyan una potente herramienta en síntesis

111. Ramberg, L.; Backlund, B., The reactions of some monohalogen derivatives of diethyl sulfone. **1940**, 13A, (No. 27), 50 pp.

112. Cuvigny, T.; Dupenhoat, C. H.; Julia, M., Syntheses with sulfones .47. Stereoselective access to 1,3-dienes and 1,4-dienes through hydrogenolysis of benzenesulfonyldienes - application to pheromone synthesis. *Tetrahedron* **1987**, 43, (5), 859-872.

113. Miyamoto, N.; Fukuoka, D.; Utimoto, K.; Nozaki, H., Reaction of styryl sulfoxides or sulfones with boranes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1974**, 47, (2), 503-504.

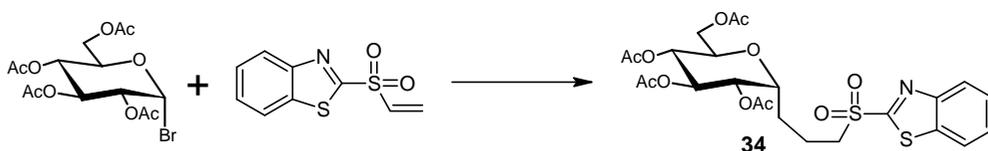
114. Guan, Z. H.; Zuo, W.; Zhao, L. B.; Ren, Z. H.; Liang, Y. M., An economical and convenient synthesis of vinyl sulfones. *Synthesis-Stuttgart* **2007**, (10), 1465-1470.

115. Lee, J. W.; Lee, C. W.; Jung, J. H.; Oh, D. Y., Facile synthesis of vinyl sulfones from beta-bromo alcohols. *Synthetic Communications* **2000**, 30, (16), 2897-2902.

Capítulo 1

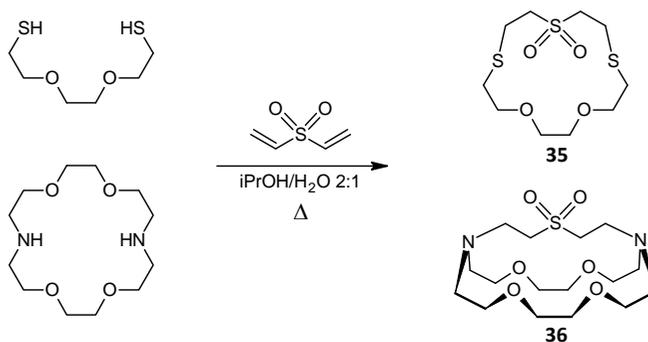
orgánica. A continuación se comentan algunos ejemplos en los que se explota su potencial como aceptores de Michael en síntesis.

Por ejemplo, Sharma y col.¹¹⁶ han aprovechado la capacidad de las vinilsulfonas para generar enlaces carbono-carbono a través de reacciones radicalarias y han desarrollado una nueva metodología de síntesis de C-glicósidos (**esquema 1.13**). Estos sistemas tienen una gran importancia ya que al igual que los O-glicósidos presentan funciones biológicas de gran importancia pudiendo actuar, por ejemplo, como agentes antitumorales o antivirales, pero con la ventaja añadida de que son resistentes a la hidrólisis enzimática.



Esquema 1.13. $n\text{-Bu}_3\text{SnH}$, AIBN, éter a reflujo.

Otra de las aplicaciones ha sido la síntesis y funcionalización de sistemas macrocíclicos de gran importancia en química supramolecular. Dupuy y col.¹¹⁷ llevaron a cabo la síntesis de sistemas macrocíclicos mediante la condensación de un fragmento difuncional con divinilsulfona (DVS), dando lugar a sistemas como los que aparecen en el **esquema 1.14**.

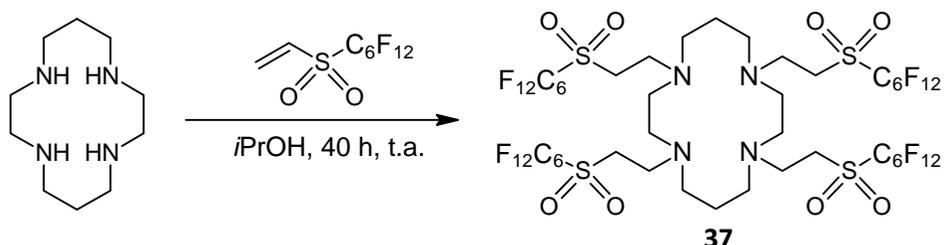


Esquema 1.14. Síntesis de macrociclos a partir de DVS.

116. Krishna, P. R.; Lavanya, B.; Jyothi, Y.; Sharma, G. V. M., Radical mediated diastereoselective synthesis of benzothiazole sulfonyl ethyl C-glycosides. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2003**, *22*, (6), 423-431.

117. Teyssot, M. L.; Fayolle, M.; Philouze, C.; Dupuy, C., Bis-heteronucleophilic Michael addition to divinyl sulfone: A new efficient access to macrocycles. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, (1), 54-62.

Recientemente Larpent y col.¹¹⁸ han decorado tetraazamacrociclos con átomos de flúor mediante la adición a los grupos amino del ciclo de vinilsulfonas funcionalizadas, dando lugar a sistemas con propiedades catalíticas (**esquema 1.15.**).



Esquema 1.15. Decoración de tetraazamacrociclos con átomos de flúor.

Se han utilizado también en síntesis asimétrica¹¹⁹ y como soportes en síntesis en fase sólida¹²⁰. Sin embargo, desde un punto de vista biotecnológico su potencial va más allá habiendo encontrado aplicación como agentes de entrecruzamientos, en inmovilización y modificación de biomoléculas y como inhibidores de diversos procesos enzimáticos

118. de Castries, A.; Magnier, E.; Monmotton, S.; Fensterbank, H.; Larpent, C., An expedient synthesis of perfluorinated tetraazamacrocycles: New ligands for copper-catalyzed oxidation under fluororous biphasic conditions. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, (20), 4685-4692.

119. Carretero, J. C.; Arrayas, R. G.; Buezo, N. D.; Garrido, J. L.; Alonso, I.; Adrio, J., Recent applications of vinyl sulfones and vinyl sulfoxides in asymmetric synthesis. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **1999**, 153, 259-273.

120. Kroll, F. E. K.; Morphy, R.; Rees, D.; Gani, D., Resin-immobilised benzyl and aryl vinyl sulfones: New versatile traceless linkers for solid-phase organic synthesis. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38, (49), 8573-8576.

1.3.2. Aplicaciones biotecnológicas.

1.3.2.1. Agentes de entrecruzamiento.

El uso de las vinilsulfonas como agentes de entrecruzamiento ha sido uno de los campos en los que han encontrado una mayor aplicabilidad. La DVS se ha utilizado para entrecruzar y derivatizar proteínas^{121,122}, así como para el entrecruzamiento de polisacáridos naturales como por ejemplo dextrano¹²³, ácido hialurónico¹²⁴ o celulosa¹²⁵. La DVS es un agente de entrecruzamiento más universal que las maleimidias, las iodoacetamidias o las N-hidroxisuccinimidias ya que es capaz de reaccionar con distintos nucleófilos. Otras ventajas que presenta la DVS son su disponibilidad, estabilidad, solubilidad en agua y bajo precio.

Así, Houen y col.¹²⁶ pusieron a punto una metodología para la **activación de proteínas** con DVS que les permitió obtener conjugados de proteínas y péptidos en condiciones suaves para su empleo como reactivos en inmunoensayos y en inmunización. Estos autores comprobaron que las proteínas preactivadas con DVS podían almacenarse a -20°C durante un largo periodo de tiempo antes de llevar a cabo la conjugación. Por otro lado, Lees y col.¹²⁷ han desarrollado una metodología que les permite obtener vacunas basadas en **conjugados proteína-carbohidrato** a través del empleo de DVS vía funcionalización del polisacárido (PolyS) u oligosacárido con uno o varios grupos amina, tiol o hidracina que posteriormente

121. Gabor, F.; Schwarzbauer, A.; Wirth, M., Lectin-mediated drug delivery: binding and uptake of BSA-WGA conjugates using the Caco-2 model. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, 237, (1-2), 227-239.

122. Sereikaite, J.; Bassus, D.; Bobnis, R.; Dienys, G.; Bumeliene, Z.; Bumelis, V. A., Divinyl sulfone as a crosslinking reagent for oligomeric proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2003**, 29, (3), 227-230.

123. Gehrke, S. H.; Uhden, L. H.; McBride, J. F., Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems. *Journal of Controlled Release* **1998**, 55, (1), 21-33.

124. Ramamurthi, A.; Vesely, I., Smooth muscle cell adhesion on crosslinked hyaluronan gels. *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 60, (1), 196-205.

125. Maleki, A.; Kjoniksen, A. L.; Knudsen, K. D.; Nystrom, B., Dynamical and structural behavior of hydroxyethylcellulose hydrogels obtained by chemical gelation. *Polymer International* **2006**, 55, (3), 365-374.

126. Houen, G.; Jensen, O. M., Conjugation to preactivated proteins using divinylsulfone and iodoacetic acid. *Journal of Immunological Methods* **1995**, 181, (2), 187-200.

127. Lees, A. Water-soluble reagents and conjugates with high deg. of loading using vinyl sulphone group to link molecules, used particularly for production of vaccines or immunological reagents. WO9741897-A; EP930895-A; WO9741897-A1; AU9731252-A; EP930895-A1; JP2000511889-W; AU728026-B; US6309646-B1.

derivatizaron con un gran exceso de DVS (PolyS-VS), para evitar que se produjeran entrecruzamientos. Una vez obtenido el derivado PolyS-VS se hace reaccionar con la proteína correspondiente. Además de la propia DVS utilizaron otras divinilsulfonas de mayor longitud, como la bis-1,6-(vinilsulfonyl)hexano (“BioLink-6”), así como otros agentes de entrecruzamiento heterofuncionales.

La DVS también se ha utilizado para el entrecruzamiento de **agarosa**^{128,129}. Se trata de un polisacárido natural inerte y no tóxico que se utiliza en un gran número de técnicas de Biología Molecular, Bioquímica y Biología Celular, en concreto es una de las matrices más utilizadas en cromatografía. A través del entrecruzamiento con DVS se consigue mejorar su estabilidad química frente a medios ácidos y básicos así como sus propiedades mecánicas, lo que permite utilizar flujos mayores y emplearlo como matriz en HPLC.

Pero la DVS no ha sido el único agente de entrecruzamiento, sino que se han utilizado también otros sistemas funcionalizados con VS, siendo los derivados de PEG los más frecuentes en bibliografía. Los polímeros de PEG han encontrado un gran número de aplicaciones biológicas debido a su carácter hidrofílico, su elevada biocompatibilidad y por ser poco inmunoreactivos. Panitch y col.¹³⁰ llevaron a cabo el entrecruzamiento de un péptido de unión a heparina con un polímero de PEG funcionalizado con VS. Cuando este sistema se mezcla con heparina las interacciones existentes entre la heparina y el péptido facilitan la formación de este hidrogel físico. Aunque la heparina se encuentra unida a estos péptidos el tamaño de ésta permite la unión de otros péptidos o proteínas que presenten afinidad por este polisacárido. Los estudios que llevaron a cabo ponen de manifiesto que estos materiales son capaces de retener y liberar péptidos de unión a heparina a diferentes velocidades, que no sólo dependen de la velocidad de difusión sino que también dependen de la afinidad relativa hacia la heparina. Estos sistemas se pueden utilizar como matrices para la liberación controlada de estos péptidos y proteínas de unión a heparina (**figura 1.12.**).

128. Porath, J.; Laas, T.; Janson, J. C., Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes .3. Rigid agarose gels crosslinked with divinyl sulfone (DVS). *Journal of Chromatography* **1975**, 103, (1), 49-62.

129. Hjerten, S.; Wu, B. L.; Liao, J. L., An high-performance liquid-chromatographic matrix based on agarose cross-linked with divinyl sulfone. *Journal of Chromatography* **1987**, 396, 101-113.

130. Seal, B. L.; Panitch, A., Physical polymer matrices based on affinity interactions between peptides and polysaccharides. *Biomacromolecules* **2003**, 4, (6), 1572-1582.

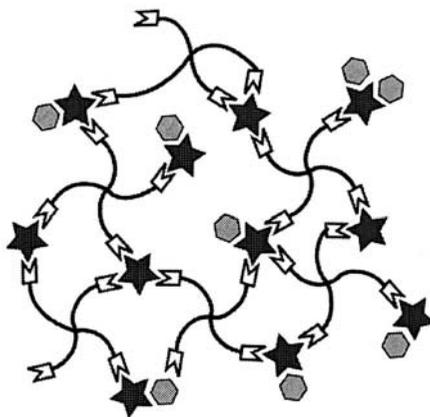


Figura 1.12.

Steffens y col.¹³¹ han trabajado en el desarrollo de un sistema que permite liberar de forma controlada una proteína bioactiva en su sitio de acción durante un periodo de tiempo relativamente largo. Una de las metodologías que han empleado consiste en unir covalentemente la proteína a una matriz de tal manera que la proteína se vaya liberando a medida que la matriz a la que se encuentra unida se va degradando. Como matriz eligieron colágeno, ya que es biocompatible y al degradarse genera productos que no son nocivos, y utilizaron el agente de entrecruzamiento comercial NHS-PEG₃₄₀₀-VS (succinimidil-poli(etilenglicol)-vinilsulfona). En primer lugar llevaron a cabo la reacción de conjugación con la proteína vía éster activado (proteína-PEG-VS), a continuación funcionalizaron el colágeno con grupos SH, que utilizaron para unir covalentemente la proteína a través de la reacción con el grupo vinilsulfona. Estos mismos autores estudiaron estos procesos de entrecruzamiento empleando “*homocrosslinker*”, tal como SS-PEG-SS, sin embargo los resultados obtenidos fueron significativamente peores que los conseguidos con el “*heterocrosslinker*” NHS-PEG-VS.

Otra ejemplo lo encontramos en el trabajo de Hubbell y col.¹³² quienes llevaron a cabo la síntesis de un **hidrogel híbrido** PEG-péptido a través de reacciones de adición tipo Michael a vinilsulfonas. Tenían como objetivo sintetizar

131. Chen, J. S.; Noah, E. M.; Pallua, N.; Steffens, G. C. M., The use of bifunctional polyethyleneglycol derivatives for coupling of proteins to and cross-linking of collagen matrices. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2002**, 13, (11), 1029-1035.

132. Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A., Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules* **2003**, 4, (3), 713-722.

una estructura polimérica que mimetizara las matrices extracelulares naturales (ECMs), debido al gran interés que estas presentan. Utilizaron PEG ramificado y funcionalizado con grupos VS con distintos pesos moleculares y los entrecruzaron con oligopéptidos que contenían dos grupos tiol libres. El entrecruzamiento se llevó a cabo a pH=8 y a 25°C. En estas condiciones la formación del gel tiene lugar en minutos.

1.3.2.2. Inmovilización de biomoléculas.

La alta reactividad del grupo vinilsulfona ha sido explotada para la inmovilización de distintos tipos de moléculas que contengan grupos amina, tiol o hidroxilo habiendo encontrado aplicabilidad en la inmovilización de biomoléculas portadoras de estos grupos funcionales. De hecho existen soportes comerciales: (i) **poliestireno** (comercializados por Aldrich) (ii) **agarosa** (comercializada por Gentaur) y (iii) **sefarosa** (comercializada por Affiland).

Uno de los campos en los que más se ha empleado este tipo de soportes ha sido en el desarrollo de materiales para cromatografía de afinidad, particularmente existen varios ejemplos en los que son utilizados para el aislamiento de lectinas. Uno de los pioneros en este campo fue Porath¹³³ al inmovilizar D-manosa sobre **sefarosa** activada con DVS y utilizar este sistema en el aislamiento de lectinas a partir de un extracto de semillas de *Vicia Ervilia*. Goldstein y col.¹³⁴, haciendo uso también de **sefarosa** activada con DVS, llevaron a cabo la inmovilización de N-acetilgalactosamina. Este sistema lo utilizaron para el aislamiento de la isolectina B₄ de *Griffonia simplicifolia* a partir de una mezcla de isolectinas (A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃), ya que a diferencia de estas últimas la isolectina B₄ interacciona débilmente con este soporte. Esta isolectina tiene gran interés porque se puede utilizar para la identificación y detección de residuos terminales de α-D-galactopiranosas en polisacáridos, glicoconjugados y superficies celulares. Este mismo soporte también ha sido utilizado por Belew y col.¹³⁵ para la adsorción de glicoproteínas de suero a través de la inmovilización de ConA. Otros soportes funcionalizados con grupos

133. Fornstedt, N.; Porath, J., Characterization studies on a new lectin found in seeds of vicia-ervilia. *Febs Letters* **1975**, 57, (2), 187-191.

134. Winter, H. C.; Goldstein, I. J., Facile preparation of the alpha-Gal-recognizing *Griffonia simplicifolia* I-B-4 isolectin. *Carbohydrate Research* **2004**, 339, (1), 153.

135. Zhao, Y. J.; Belew, M., The effect of various coupling methods on the adsorption of serum proteins by immobilized Concanavalin A. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1986**, 8, (1), 75-82.

Capítulo 1

vinilsulfona se han utilizado para la inmovilización de enzimas¹³⁶ y anticuerpos¹³⁷.

El grupo vinilsulfona de estos soportes también se ha utilizado para la preparación de materiales más elaborados, en concreto para la obtención de **resinas tiofílicas** o T-gel. Este tipo de materiales explotan lo que se conoce como absorción tiofílica¹³⁸, que se basa en la afinidad de ciertas macromoléculas por resinas del tipo SOPORTE-O-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-S-R, donde R es un residuo alifático pequeño. Estos soportes se obtienen a través de la reacción *in situ* del grupo vinilsulfona con tiol derivados sencillos como mercaptoetanol. Este tipo de sistemas se ha utilizado fundamentalmente en la purificación de anticuerpos^{139, 140}.

1.3.2.3. Modificación de biomoléculas.

Los grupos funcionales presentes en proteínas, fundamentalmente los grupos amino y tiol, son capaces de participar en adiciones tipo Michael con vinilsulfonas. Continuando con la búsqueda de nuevos reactivos para determinar el número de residuos de lisina reactivos o químicamente accesibles en ciertos tipos de proteínas alimenticias Friedman y col.¹⁴¹ utilizaron metil-vinilsulfona(MVS) y etil-vinilsulfona (EVS). Estos autores comprobaron que estos reactivos son capaces de modificar los grupos amino de las lisinas por lo que pueden ser utilizados como reactivos para llevar a cabo estudios de estructura y reactividad en proteínas.

136. Gancarz, I.; Bryjak, J.; Bryjak, M.; Pozniak, G.; Tylus, W., Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization 1. Allyl alcohol plasma. *European Polymer Journal* **2003**, 39, (8), 1615-1622.

137. Ubrich, N.; Hubert, P.; Regnault, V.; Dellacherie, E.; Rivat, C., Compared stability of sepharose-based immunoabsorbents prepared by various activation methods. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **1992**, 584, (1), 17-22.

138. Porath, J.; Maisano, F.; Belew, M., Thiophilic adsorption - a new method for protein fractionation. *Febs Letters* **1985**, 185, (2), 306-310.

139. Schwarz, A.; Kohen, F.; Wilchek, M., Novel sulfone-based thiophilic ligands for the high-performance liquid-chromatographic purification of antibodies. *Reactive Polymers* **1994**, 22, (3), 259-266.

140. Coffinier, Y.; Legallais, C.; Vijayalakshmi, M. A., Separation of IgG from human plasma using thiophilic hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science* **2002**, 208, (1-2), 13-22.

141. Friedman, M.; Finley, J. W., Reactions of amino-acids, peptides, and proteins with alpha,beta-unsaturated compounds .31. Reactions of proteins with ethyl vinyl sulfone. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1975**, 7, (6), 481-486.

Estos mismos autores llevaron a cabo un estudio en el que pretendían establecer la capacidad del grupo tiol de las cisteínas para reaccionar con MVS o EVS¹⁴². Concluyeron:

- ✓ MVS y EVS reaccionan en condiciones suaves con los grupos funcionales de las proteínas.
- ✓ Los grupos tiol de las cisteínas son más susceptibles de reaccionar con vinilsulfonas que los ϵ -amino de las lisinas y el anillo imidazol de las histidinas.
- ✓ El pH se puede utilizar para controlar la alquilación de estos grupos.

La reacción de proteínas con DVS también ha permitido mejorar ciertas técnicas de **secuenciación de proteínas**. La secuenciación de proteínas mediante LC-MS/MS de los péptidos que se generan tras la proteólisis de las mismas es una técnica de gran importancia en proteómica. Fales y col.¹⁴³, a través de las modificaciones de estos péptidos con DVS, consiguieron aumentar la sensibilidad de señales clave como las correspondientes al residuo N-terminal de los péptidos que en algunos casos era incluso inexistente

Otra aplicación del grupo vinilsulfona ha sido la **pegilación** de proteínas que tiene gran interés, como ya se ha comentado anteriormente, para la estabilización y solubilización de las mismas y en concreto de enzimas. Harris y col.¹⁴⁴ llevaron a cabo la síntesis de PEG-VS impulsados por los trabajos previos de Friedman¹⁴² que acabamos de citar, los cuales ponían de manifiesto que compuestos de pequeño tamaño, como la etil o metil vinilsulfona, son selectivos frente a grupos tiol en presencia de aminas. Mediante la modificación de pequeñas moléculas, como β -mercatoetanol, N-acetilcisteína, glutatión etc..., con el derivado PEG-VS llegaron a la conclusión de que estos derivados de VS presentan una elevada selectividad frente a grupos tiol en comparación con grupos amino, siempre desde un punto de vista cinético y por lo tanto pueden ser utilizados para llevar a cabo la pegilación de proteínas de manera específica sobre los residuos cisteína de la misma. Otra de las

142. Masri, M. S.; Friedman, M., Protein reactions with methyl and ethyl vinyl sulfones. *Journal of Protein Chemistry* **1988**, *7*, (1), 49-54.

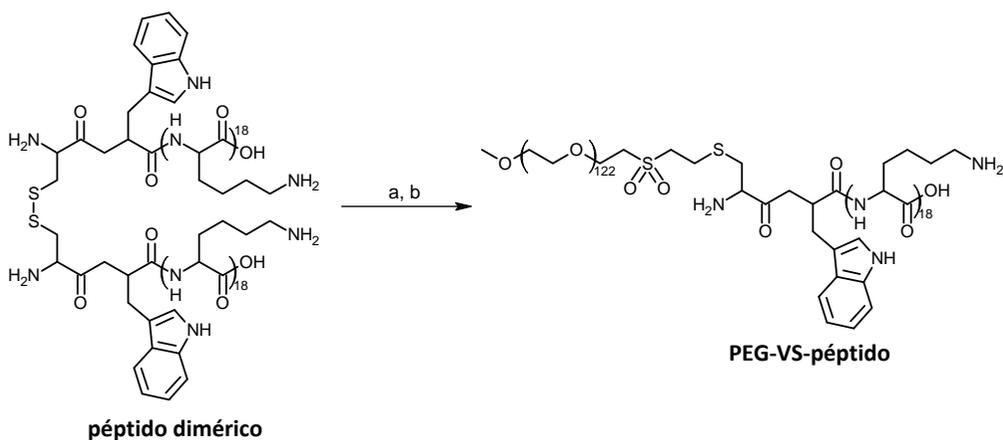
143. Boja, E. S.; Sokoloski, E. A.; Fales, H. M., Divinyl sulfone as a postdigestion modifier for enhancing the a(1) ion in MS/MS and postsource decay: Potential applications in proteomics. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, (14), 3958-3970.

144. Morpurgo, M.; Veronese, F. M.; Kachensky, D.; Harris, J. M., Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) vinyl sulfone. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, (3), 363-368.

Capítulo 1

grandes ventajas del grupo vinilsulfona es que no genera subproductos, lo cual es tremendamente importante cuando se obtienen materiales biológicos con un potencial uso terapéutico, la reacción es altamente eficiente y, además, la unión de PEG a biomoléculas a través de la función vinilsulfona evita que el sistema se degrade a través de procesos de hidrólisis como ocurre, por ejemplo, cuando la unión se establece a través de enlaces de tipo éster. Estos autores también pusieron de manifiesto, mediante ensayos de RMN, que el compuesto PEG-VS era estable en agua a pH 7-9, estabilidad que tiene una gran importancia para su preparación a gran escala. Debido al gran interés de este tipo de sistemas Marsh y col.¹⁴⁵ mejoraron la síntesis de los mismos.

Los derivados de PEG fucionalizados con grupos vinilsulfona no sólo se han utilizado para llevar a cabo la pegilación de proteínas con el fin de aumentar su estabilidad y solubilidad. Rice y col.^{146,147} han modificado péptidos de bajo peso molecular con estos compuestos (**esquema 1.16.**) y los han utilizado para llevar a cabo **transfecciones**, que consisten en la introducción de material genético externo en células.



Esquema 1.16. Condiciones: (a) TCEP, (b) PEG-VS.

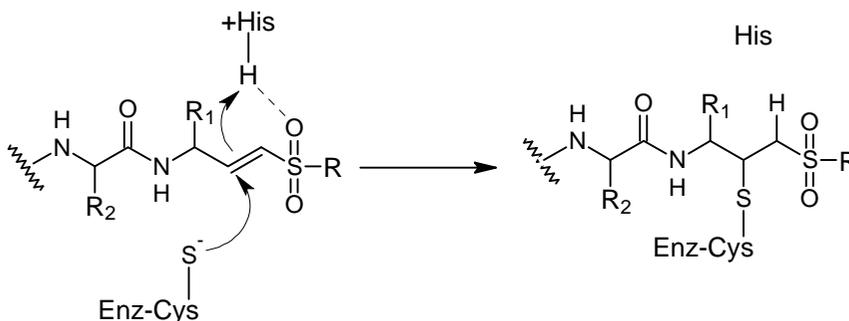
145. Khan, A.; Marsh, A., Improved preparation and application of poly(ethylene glycol) vinyl sulfone. *Synthetic Communications* **2000**, 30, (14), 2599-2608.

146. Park, Y.; Kwok, K. Y.; Boukarim, C.; Rice, K. G., Synthesis of sulfhydryl cross-linking poly(ethylene glycol)-peptides and glycopeptides as carriers for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, 13, (2), 232-239.

147. Kwok, K. Y.; McKenzie, D. L.; Evers, D. L.; Rice, K. G., Formulation of highly soluble poly(ethylene glycol)-peptide DNA condensates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1999**, 88, (10), 996-1003.

1.3.2.4. Inhibición de diversos procesos enzimáticos.

Este grupo funcional presenta la capacidad de inhibir un gran número de procesos enzimáticos, más concretamente, las vinilsulfonas son bien conocidas por su habilidad para inhibir muchos tipos de **cisteín-proteasas**¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. Las cisteín-proteasas tienen un gran interés para la industria farmacéutica ya que muchas de estas enzimas están implicadas en un gran número de enfermedades tales como cáncer, la enfermedad de Alzheimer, inflamación, artritis y enfermedades relacionadas con infecciones víricas y parasitarias entre otras, lo que hace que estas enzimas sean dianas terapéuticas de gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos. Las vinilsulfonas, a través de la adición conjugada 1,4 del grupo tiol del residuo de cisteína que forma parte del centro activo del enzima, dan lugar a un enlace tioéter estable que la inactiva irreversiblemente (**esquema 1.17.**). En los mecanismos propuestos, el oxígeno del grupo sulfona podría formar enlaces de hidrógeno con una histidina del centro activo, lo que mejoraría la velocidad de inhibición. Así por ejemplo, McKerrow y col. han puesto de manifiesto que varias vinilsulfonas son inhibidores de la cruzaina¹⁵¹, una cisteín-proteasa que juega un papel crucial en el ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*, protozoo causante de la enfermedad de Chagas.



Esquema 1.17. Mecanismo de inhibición de cisteín-proteasas mediante vinilsulfonas.

148. Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D., Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, (17), 3193-3196.

149. Roush, W. R.; Gwaltney, S. L.; Cheng, J. M.; Scheidt, K. A.; McKerrow, J. H.; Hansell, E., Vinyl sulfonate esters and vinyl sulfonamides: Potent, irreversible inhibitors of cysteine proteases. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (42), 10994-10995.

150. Marquis, R. W., Inhibition of the cysteine protease cathepsin K (EC 3.4.22.38). *Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 39* **2004**, 39, 79-98.

151. Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H., Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* **1998**, 188, (4), 725-734.

Capítulo 1

Las vinilsulfonas también han sido explotadas recientemente como inhibidores de otros dos tipos de enzimas distintas de las cisteín-proteasas: *Staphylococcus aureus* sortasa¹⁵² y VIH-1 integrasa¹⁵³. *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de personas sanas y que causa una gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas), hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida, como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis. Por otro lado, los inhibidores de la integrasa constituyen una de las nuevas familias de medicamentos en desarrollo para el tratamiento antirretroviral. La integrasa es una proteína imprescindible para el ciclo vital de VIH, ya que regula la transferencia y la integración del ADN viral en el cromosoma de la célula. Por lo tanto, esta nueva diana terapéutica presenta un enorme potencial para el desarrollo de nuevos fármacos, con la ventaja añadida de que la inhibición de la integrasa tiene un carácter irreversible.

Debido al gran interés de estos sistemas como inhibidores de procesos enzimáticos, se han desarrollado diferentes metodologías para la síntesis química de librerías de **péptidos-VS** así como de moléculas no peptídicas con la funcionalización VS^{154,155}. En concreto, Yao y col.¹⁵⁶ han desarrollado una metodología para llevar a cabo la síntesis en fase sólida de este tipo de sistemas que se esquematiza en la **figura 1.13.** Mediante esta estrategia es posible introducir diversas funcionalizaciones en las posiciones P₁, P₁' y P₂ que juegan un papel muy importante en las interacciones de estos inhibidores en potencia con las cisteín-proteasas (**figura 1.13.B**) lo que hace que esta estrategia sea aplicable a la generación de librerías de inhibidores para distintas cisteín proteasas.

152. Frankel, B. A.; Bentley, M.; Kruger, R. G.; McCafferty, D. G., Vinyl sulfones: Inhibitors of SrtA, a transpeptidase required for cell wall protein anchoring and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (11), 3404-3405.

153. Meadows, D. C.; Mathews, T. B.; North, T. W.; Hadd, M. J.; Kuo, C. L.; Neamati, N.; Gervay-Hague, J., Synthesis and biological evaluation of geminal disulfones as HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, (14), 4526-4534.

154. Wang, G.; Mahesh, U.; Chen, G. Y. J.; Yao, S. Q., Solid-phase synthesis of peptide vinyl sulfones as potential inhibitors and activity-based probes of cysteine proteases. *Organic Letters* **2003**, 5, (5), 737-740.

155. Overkleeft, H. S.; Bos, P. R.; Hekking, B. G.; Gordon, E. J.; Ploegh, H. L.; Kessler, B. M., Solid phase synthesis of peptide vinyl sulfone and peptide epoxyketone proteasome inhibitors. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, (32), 6005-6009.

156. Wang, G.; Yao, S. Q., Combinatorial synthesis of a small-molecule library based on the vinyl sulfone scaffold. *Organic Letters* **2003**, 5, (23), 4437-4440.

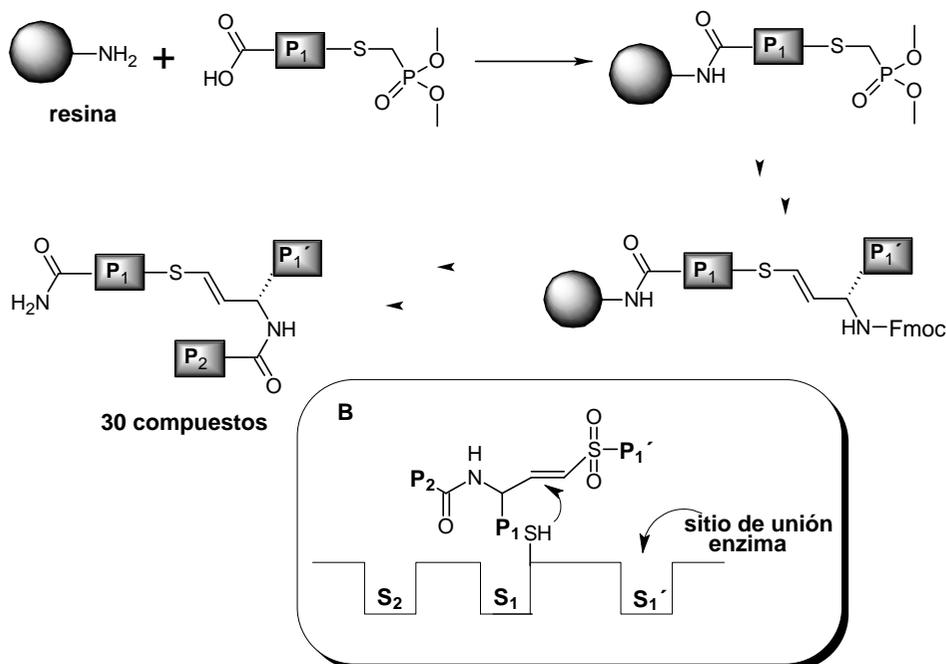


Figura 1.13. Síntesis en fase sólida de péptidos y estructuras no peptídicas conteniendo la función vinilsulfona.

La capacidad que presentan ciertos compuestos funcionalizados con vinilsulfona para reaccionar de forma específica con el centro activo de algunas enzimas ha permitido el empleo de estos compuestos para llevar a cabo estudios de **ABPP**. Como se ha comentado anteriormente, uno de los elementos clave que presentan las sondas que se utilizan en estos estudios es un grupo reactivo que se une de forma covalente y específica al centro activo de una enzima. El grupo VS permite que se establezca la unión covalente y el resto de la molécula le da la especificidad necesaria. Así por ejemplo, Bogyo y col.^{157,158} han utilizado ciertos compuestos, sobre todo de naturaleza peptídica, conteniendo el grupo vinilsulfona para el estudio de cisteín-proteasas del lisosoma y el estudio de la función *in vivo* del proteasoma. El proteasoma es un complejo proteico de gran tamaño que se

157. Bogyo, M.; Verhelst, S.; Bellingard-Dubouchaud, V.; Toba, S.; Greenbaum, D., Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs. *Chemistry & Biology* **2000**, 7, (1), 27-38.

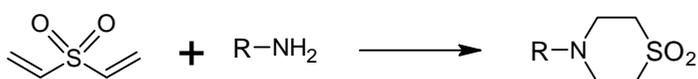
158. Bogyo, M.; McMaster, J. S.; Glas, R.; Gaczynska, M.; Tortorella, D.; Ploegh, H. L., Peptide vinyl sulfones: Inhibitors and active site probes for the study of proteasome function *in vivo*. *Peptides: Frontiers of Peptides Science* **1999**, 686-687.

Capítulo 1

encarga de realizar la degradación de proteínas no necesarias o dañadas. Esta degradación proteosómica juega un papel muy importante en el control y la regulación de diversos procesos celulares, como el ciclo celular, la expresión génica y las respuestas al estrés oxidativo, de ahí el interés de su estudio.

1.3.3. Otras aplicaciones.

Existe un método electroquimioluminiscente de detección acoplado a HPLC que utiliza el complejo tris(2,2'-bipiridina)rutenio (III) ((Ru(bpy)₃)³⁺) y que permite llevar a cabo, de forma selectiva y con elevada sensibilidad, la determinación de oxalatos, índoles y trialquilaminas, tanto en muestras biológicas como farmacéuticas. Sin embargo, cuando este mismo método se aplica a la determinación de aminas primarias la sensibilidad del mismo se reduce del orden 1000 veces. Para poder llevar a cabo la determinación de aminas primarias Uchikura y col. llevaron a cabo la derivatización de las mismas con DVS ya que mediante esta metodología es posible transformar una amina primaria en una terciaria, tal y como se muestra en el **esquema 1.18**. Este método lo han aplicado para la determinación de aminas alifáticas¹⁵⁹, las cuales presentan un gran interés industrial y también en la determinación de aminoácidos¹⁶⁰ en plasma humano. Una ventaja adicional que presenta esta reacción, y que no se alcanza con otras derivatizaciones que se llevan a cabo, es que la reacción es cuantitativa y los productos que se generan son totalmente estables.



Esquema 1.18. Transformación de una amina primaria en una amina terciaria mediante DVS.

159. Uchikura, K.; Kirisawa, M.; Sugii, A., Electrochemiluminescence detection of primary amines using tris(bipyridine)ruthenium(III) after derivatization with divinylsulfone. *Analytical Sciences* **1993**, *9*, (1), 121-123.

160. Uchikura, K., Determination of aromatic and branched-chain amino acids in plasma by HPLC with electrogenerated Ru(bpy)₃(3+) chemiluminescence detection. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2003**, *51*, (9), 1092-1094.

Las vinilsulfonas también han encontrado un hueco en la industria textil como grupo reactivo en colorantes para el teñido de diferentes fibras como, por ejemplo, nylon¹⁶¹, algodón¹⁶² o seda¹⁶³. Algunos de estos colorantes se presentan en la **figura 1.14**. Estos reactivos también se han utilizado para la coloración del pelo¹⁶⁴ y de lentes de contacto¹⁶⁵.

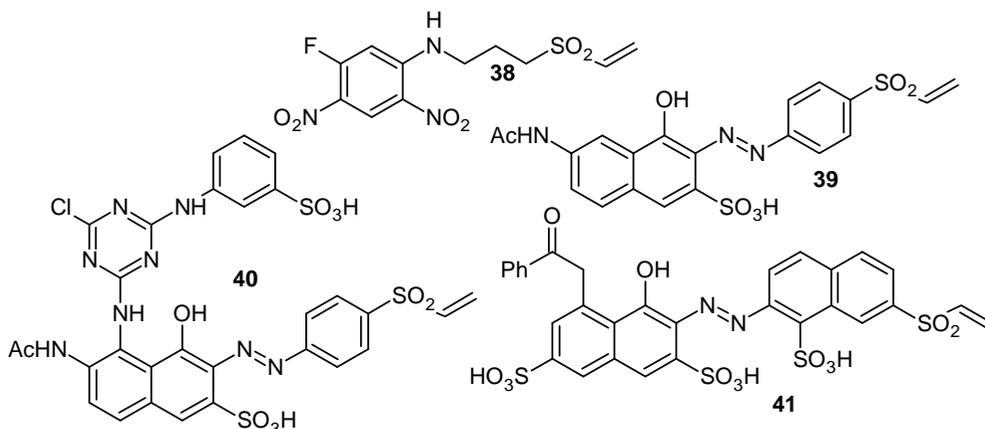


Figura 1.14. Colorantes funcionalizados con el grupo vinilsulfona.

161. Burkinshaw, S. M.; Wills, A. E., The dyeing of conventional and microfibre Nylon 6,6 with reactive dyes .3. Vinyl sulphone and chlorotriazine dyes. *Dyes and Pigments* **1997**, 34, (3), 243-253.

162. Chhagani, R. R.; Iyer, V.; Shenai, V. A., Modifying cotton for dyeing. *Colourage* **2000**, 47, (2), 27-28, 30-32.

163. Lakkumi, N.; Sundaram, A., A study on dyeing of silk using reactive dyes. *Textile Dyer & Printer* **1991**, 24, (4), 32.

CAPÍTULO 2
SÍNTESIS DE AGENTES BIOTINILANTES Y DE
ETIQUETADO FLUORESCENTE BASADOS EN
VINILSULFONAS. APLICACIONES.

Capítulo 2.

SÍNTESIS DE AGENTES BIOTINILANTES Y DE ETIQUETADO FLUORESCENTE BASADOS EN VINILSULFONAS. APLICACIONES.

2.1. Etiquetado de biomoléculas.

Un aspecto fundamental de cara al uso de cualquier marcaje es la unión a la biomolécula y la estabilidad de dicha unión. Desde un punto de vista químico existen cuatro grupos presentes en las biomoléculas susceptibles de actuar como dianas de los reactivos de marcaje, convenientemente derivatizados, para formar enlace covalente:

2.1.1. Aminas.

Son la diana más común de los reactivos de modificación covalente y la principal en proteínas. La mayor parte de las proteínas tienen el extremo amino de la molécula libre y prácticamente todas tienen unidades de lisina, residuo en cuya cadena lateral hay un grupo ϵ -amino fácilmente modificable dado que se localiza mayoritariamente en la superficie. Reaccionan con reactivos acilantes y la reactividad es dependiente del reactivo acilante, del tipo de amina, basicidad y pH de reacción. Las aminas alifáticas, como la de la cadena lateral de la lisina, son moderadamente básicas y reaccionan con la mayoría de los reactivos acilantes a pH superior a 8. Tres son las derivatizaciones principales de los reactivos de marcaje que reaccionan con las aminas de las biomoléculas:

Succinimidil ésteres¹⁶⁶. Reaccionan con aminas para originar amidas. Es la derivatización más frecuente porque el enlace amida que se forma es tan estable como un enlace peptídico. Reaccionan bien con aminas alifáticas y presentan baja reactividad con aminas aromáticas, alcoholes, fenoles (tirosina) e histidina. En presencia de tioles pueden formar tioésteres pero en proteínas el grupo acilo puede ser transferido a una amina vecina. Los succinimidil ésteres pueden

166. Becker, J. M.; Wilchek, M.; Katchalski, E. Irreversible inhibition of biotin transport in yeast by biotinyl para nitrophenyl ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1971**, 68, (10), 2604.

Capítulo 2

hidrolizarse, aunque normalmente por debajo de pH 9 este proceso es muy lento. Uno de los principales inconvenientes de los succinimidil ésteres es su solubilidad en agua, que en algunos casos puede ser muy baja. Por ello en el mercado existen derivados de ácidos carboxílicos que pueden convertirse en sulfosuccinimidil ésteres¹⁶⁷ o STP (4-sulfo-2,3,4,6-tetrafluorofenol) ésteres¹⁶⁸, que son más polares, y por ello más solubles en agua, aunque también menos reactivos con aminas poco expuestas.

Isotiocianatos. Reaccionan con aminas para formar tioureas, las cuales son razonablemente estables, aunque se ha descrito la degradación de la conjugación en anticuerpos marcados con isotiocianatos fluorescentes¹⁶⁹. Los isotiocianatos presentan una reactividad moderada, pero son muy estables en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. A pesar de que ha crecido el número de reactivos de etiquetado de aminas la FITC (isotiocianato de fluoresceína) y TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) siguen siendo de los más utilizados para el etiquetado de anticuerpos.

Cloruros de sulfonilo. Reaccionan con aminas y producen sulfonamidas. Son muy reactivos e inestables en medios acuosos¹⁷⁰, especialmente al pH alcalino necesario para que reaccionen con las aminas alifáticas, por lo que hay que trabajar a baja temperatura. Una vez conjugados el enlace es extremadamente estable y resistente, por ejemplo, a la hidrólisis completa de la proteína¹⁷¹. También reaccionan con fenoles (tirosina), alcoholes alifáticos (polisacáridos), tioles (cisteína), e imidazoles (histidina), aunque los conjugados con tioles e imidazoles son inestables y los conjugados con alcoholes alifáticos pueden sufrir desplazamientos nucleofílicos.

167. Staros, J. V.; Wright, R. W.; Swingle, D. M., Enhancement by n-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical Biochemistry* **1986**, 156, (1), 220-222.

168. Gee, K. R.; Archer, E. A.; Kang, H. C., 4-Sulfotetrafluorophenyl (STP) esters: New water-soluble amine-reactive reagents for labeling biomolecules. *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, (8), 1471-1474.

169. Banks, P. R.; Paquette, D. M., Comparison of 3 common amine reactive fluorescent-probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6, (4), 447-458.

170. Lefevre, C.; Kang, H. C.; Haugland, R. P.; Malekzadeh, N.; Arttamangkul, S., Texas Red-X and rhodamine Red-X, new derivatives of sulforhodamine 101 and lissamine rhodamine B with improved labeling and fluorescence properties. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, 7, (4), 482-489.

171. Seiler, N., Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. *Methods Biochem Anal* **1970**, 18, 259-337.

Otras funcionalizaciones.

Aldehídos: reaccionan con las aminas para formar bases de Schiff que tras reducirse dan lugar a la formación de aminas secundarias. Se han preparado derivados del o-ftalaldehído (OPA), naftalendicarboxaldehído (NDA) y 3-acrilquinilencarboxaldehído (ATTO-TAG)^{172,173} y se han empleado en la cuantificación de aminas en solución, mediante HPLC o electroforesis capilar.

Agentes arilantes como el cloruro o fluoruro de 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD)^{174,175}.

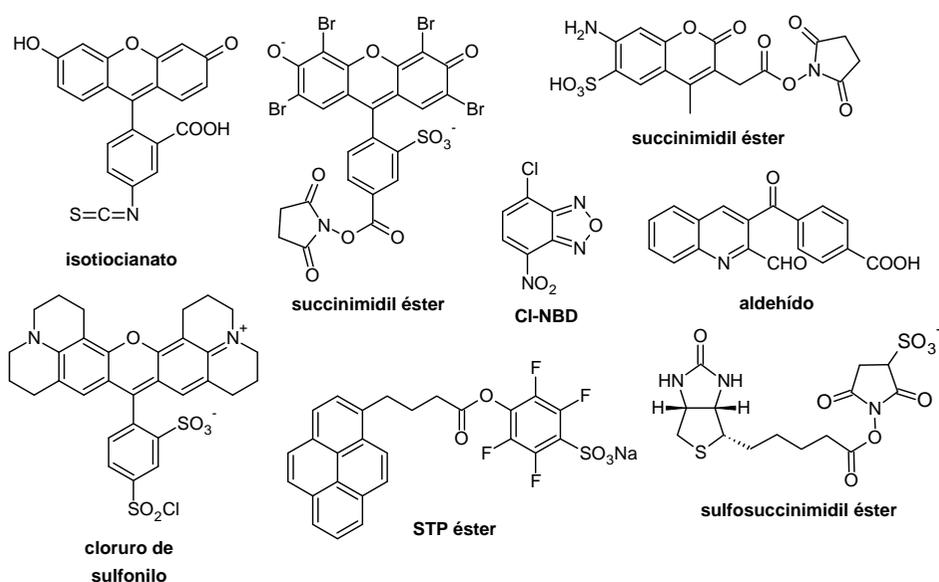


Figura 2.1. Agentes de etiquetado funcionalizados para su unión covalente a grupos amina.

172. Liu, J. P.; Hsieh, Y. Z.; Wiesler, D.; Novotny, M., Design of 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde as a reagent for ultrasensitive determination of primary amines by capillary electrophoresis using laser fluorescence detection. *Analytical Chemistry* **1991**, 63, (5), 408-412.

173. Beale, S. C.; Hsieh, Y. Z.; Wiesler, D.; Novotny, M., Application of 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of primary amines by liquid-chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography* **1990**, 499, 579-587.

174. Ghosh, P. B.; Whitehou.Mw, 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole - a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochemical Journal* **1968**, 108, (1), 155.

175. Watanabe, Y.; Imai, K., Precolumn labeling for high-performance liquid-chromatography of amino-acids with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole and its application to protein hydrolysates. *Journal of Chromatography* **1982**, 239, (APR), 723-732.

2.1.2. Tioles.

Son dianas más selectivas que el grupo amino, pues son menos frecuentes en biomoléculas y para ser reactivos tienen que estar libres (no formar puente disulfuro). El grupo sulfhidrilo puede ser introducido en la macromolécula a través de modificación química¹⁷⁶, reducción de puentes disulfuro¹⁷⁷ o, en el caso de proteínas, vía inteína o mediante mutagénesis dirigida para introducir unidades de cisteína. Reaccionan a pH fisiológico (pH 6.5–8) con reactivos alquilantes para originar tioéteres estables y con muchos de los reactivos acilantes de aminas, incluyendo isotiocianatos y succinimidil ésteres, aunque los productos de la reacción no son lo suficientemente estables como para ser utilizados en modificaciones de rutina. Dos son las principales derivatizaciones de los reactivos de marcaje que reaccionan selectivamente con los tioles de las biomoléculas:

Yodoacetamidas¹⁷⁸. Reaccionan fácilmente con todo tipo de tioles para formar tioéteres. En proteínas, cuando no tenemos grupos cisteína o estos se encuentran bloqueados, pueden reaccionar con metionina^{179,180}, histidina o tirosina y si el pH es lo suficientemente alcalino (pH mayor de 8) pueden hacerlo también con aminas alifáticas. Estos reactivos son sensibles a la luz, sobre todo cuando se encuentran en solución, por lo que las reacciones tienen que llevarse a cabo en ausencia de luz.

Maleimididas¹⁸¹. Son los reactivos más empleados tanto para la modificación de grupos tiol como para la cuantificación y análisis de los mismos. La reacción implica la adición del grupo tiol al doble enlace de la maleimida lo que da lugar a la formación de un enlace tioéter. Esta reacción es específica frente a grupos tiol a pH

176. Duncan, R. J. S.; Weston, P. D.; Wrigglesworth, R., A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl-groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Analytical Biochemistry* **1983**, 132, (1), 68-73.

177. Hylarides, M. D.; Mallett, R. W.; Meyer, D. L., A robust method for the preparation and purification of antibody/streptavidin conjugates. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (3), 421-427.

178. Alhakim, A. H.; Hull, R., Chemically synthesized non-radioactive biotinylated long-chain nucleic-acid hybridization probes. *Biochemical Journal* **1988**, 251, (3), 935-938.

179. Chung, D. G.; Lewis, P. N., Internal architecture of the core nucleosome - fluorescence energy-transfer studies at methionine-84 of histone-h4. *Biochemistry* **1986**, 25, (18), 5036-5042.

180. Musci, G.; Berliner, L. J., Intramolecular distance measurements in alpha-lactalbumin. *Biochemistry* **1986**, 25, (17), 4887-4891.

181. Bayer, E. A.; Zalis, M. G.; Wilchek, M., 3-(N-maleimido-propionyl) biocytin - a versatile thiol-specific biotinylating reagent. *Analytical Biochemistry* **1985**, 149, (2), 529-536.

comprendido entre 6.5-7.5, mientras que a pHs superiores a 8 puede reaccionar con aminas alifáticas.¹⁸².

Otras funcionalizaciones.

Agentes arilantes como 7-cloro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD)¹⁷⁴.

Disulfuros simétricos, como la N-N´didansil-L-cisteína, y asimétricos. Estos reactivos son específicos de tioles y la unión es reversible ya que se forma un nuevo enlace disulfuro que se puede romper a través de agentes reductores como el DTT.

Recientemente se han desarrollado reactivos específicos de bis-tioles¹⁸³ los cuales permiten llevar a cabo la modificación de enlaces disulfuros en proteínas. Se forma un puente disulfuro a través de tres carbonos que evita que desaparezca esta unión, que en ocasiones juega un papel crucial en la estructura y actividad biológica de la proteína.

A diferencia de lo que ocurre en el etiquetado de los residuos de lisina, el marcaje de los grupos tiol no afecta al punto isoeléctrico de proteínas.

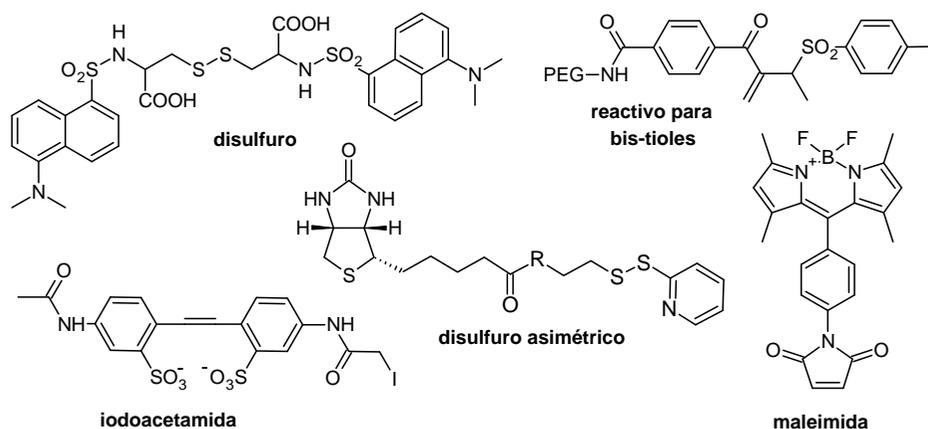


Figura 2.2. Agentes de etiquetado funcionalizados para su unión covalente a grupos tiol.

182. Wu, C. W.; Yarbrough, L. R.; Wu, F. Y. H., N-(1-pyrene)maleimide - fluorescent cross-linking reagent. *Biochemistry* **1976**, 15, (13), 2863-2868.

183. Balan, S.; Choi, J. W.; Godwin, A.; Teo, I.; Laborde, C. M.; Heidelberger, S.; Zloh, M.; Shaunak, S.; Brocchini, S., Site-specific PEGylation of protein disulfide bonds using a three-carbon bridge. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, 18, (1), 61-76.

2.1.3. Alcoholes.

La función alcohol está presente en las cadenas laterales de la tirosina, serina y treonina, en esteroides y carbohidratos, pero su reactividad en soluciones acuosas es extremadamente baja, especialmente en proteínas por la presencia de nucleófilos más activos como las aminas y los tioles. Una función que reacciona específicamente con dióles vecinales son los derivados del ácido borónico que forman complejos cíclicos^{184,185}. Este tipo de reactivos se une de forma reversible a carbohidratos de la pared celular y a glicoproteínas¹⁸⁴. Sin embargo, un procedimiento estándar para incrementar la reactividad, especialmente en el caso de carbohidratos, es la oxidación con peryodato para originar la función aldehído¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ que es capaz de reaccionar con aminas¹⁸⁹ e hidrazinas¹⁹⁰ y sus derivados.

Los residuos de tirosina reaccionan con cloruros de sulfonilo, iodoacetamidas y otros reactivos como el NBD. En algunas ocasiones se modifican selectivamente residuos de tirosina e histidina en proteínas mediante el empleo de diazoderivados¹⁹¹. Estos reactivos una vez generados o activados deben usarse inmediatamente ya que son muy inestables.

184. Burnett, T. J.; Peebles, H. C.; Hageman, J. H., Synthesis of a fluorescent boronic acid which reversibly binds to cell-walls and a diboronic acid which agglutinates erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1980**, 96, (1), 157-162.

185. Gallop, P. M.; Paz, M. A.; Henson, E., Boradephtion - a new procedure for transferring water-insoluble agents across cell-membranes. *Science* **1982**, 217, (4555), 166-169.

186. Clamp, J. R.; Hough, L., Periodate oxidation of amino acids with reference to studies on glycoproteins. *Biochemical Journal* **1965**, 94, (1), 17.

187. Geoghegan, K. F.; Emery, M. J.; Martin, W. H.; McColl, A. S.; Daumy, G. O., Site-directed double fluorescent tagging of human renin and collagenase (mmp-1) substrate peptides using the periodate-oxidation of n-terminal serine - an apparently general strategy for provision of energy-transfer substrates for proteases. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, 4, (6), 537-544.

188. Gaertner, H. F.; Offord, R. E., Site-specific attachment of functionalized poly(ethylene glycol) to the amino terminus of proteins. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, 7, (1), 38-44.

189. Shipchandler, M. T.; Fino, J. R.; Klein, L. D.; Kirkemo, C. L., 4'-[Aminomethyl]fluorescein and its n-alkyl derivatives - useful reagents in immunodiagnostic techniques. *Analytical Biochemistry* **1987**, 162, (1), 89-101.

190. Oshannessy, D. J.; Dobersen, M. J.; Quarles, R. H., A novel procedure for labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties. *Immunology Letters* **1984**, 8, (5), 273-277.

191. Wilchek, M.; Ben-Hur, H.; Bayer, E. A., p-Diazobenzoyl biocytin - a new biotinylating reagent for the labeling of tyrosines and histidines in proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, 138, (2), 872-9.

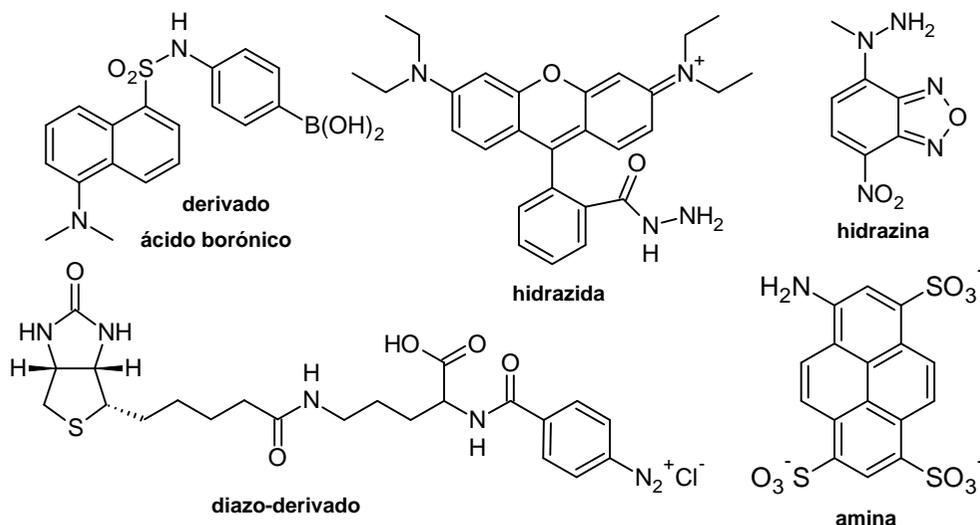
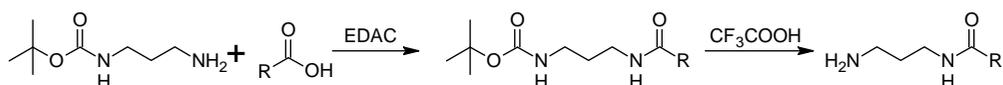


Figura 2.3. Agentes de etiquetado funcionalizados para su unión covalente a grupos alcohol.

2.1.4. Grupo carboxilo.

Son abundantes en macromoléculas pero son poco reactivos, aunque pueden convertirse en ésteres, amidas o acil-hidrazidas. En presencia de agentes de acoplamiento, como las carbodiimidas¹⁹², pueden reaccionar directamente con hidrazinas o aminas. También es posible transformar la función carboxilo en un éster activado con STP o NHSS (N-hidroxisulfosuccinimida) para que tenga lugar este acoplamiento. Otra posibilidad consiste en la transformación del ácido carboxílico en una amina alifática, a través del **esquema 2.1.**, que puede reaccionar con las funcionalizaciones anteriormente descritas para la función amina.



Esquema 2.1. Secuencia de reacciones para la transformación de un grupo carboxilo en un amino derivado.

Esta modificación elimina la carga de estos grupos carboxílicos lo que provoca un aumento en el punto isoeléctrico de la proteína.

192. Bertolatus, J. A., Affinity cytochemical labeling of glomerular-basement-membrane anionic sites using specific biotinylation and colloidal gold probes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1990**, 38, (3), 377-384.

2.1.5. Otras posibilidades.

Es posible introducir una única molécula etiqueta en el extremo C-terminal de la cadena polipeptídica mediante el empleo de un enzima, la carboxipeptidasa Y (CPD-Y)¹⁹³. El rendimiento del etiquetado suele estar en torno al 70%, por lo que es necesario separar la proteína derivatizada de la nativa.

Los residuos de glutamina también se pueden modificar enzimáticamente mediante una transglutaminasa (TGase)¹⁹⁴ y una molécula etiqueta que contenga un grupo amino. Esta reacción tiene lugar a pH 7.5 y conduce a la modificación selectiva de estos residuos.

Otra posibilidad, que no requiere ninguna funcionalización específica en la biomolécula, consiste en el empleo de reactivos que contenga una función fotosensible, como arilazidas, diaziridinas, benzofenonas o nitrobenzilos, que se activan irradiando con luz ultravioleta. Un ejemplo de este tipo de reactivos lo encontramos en la fotobiotina, que se ha utilizado en el marcaje de ADN^{195,196}

2.2. Tecnología avidina-biotina.

2.2.1. Generalidades.

La **avidina**¹⁹⁷ es una glicoproteína que se encuentra en la clara de huevo de anfibios, reptiles y aves¹⁹⁸. Se trata de un tetrámero, en realidad un dímero de dímeros, formado por cuatro subunidades iguales de 16.4kDa de peso molecular.

193. Schwarz, A.; Wandrey, C.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Enzymatic C-terminal biotinylation of proteins. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 160-162.

194. Lorand, L.; Conrad, S. M., Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1984**, 58, (1-2), 9-35.

195. Forster, A. C.; McInnes, J. L.; Skingle, D. C.; Symons, R. H., Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of dna and rna with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Research* **1985**, 13, (3), 745-761.

196. Hardwick, J. M.; Vonsprecken, R. S.; Yielding, K. L.; Yielding, L. W., Ethidium binding-sites on plasmid dna determined by photoaffinity-labeling. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259, (17), 1090-1097.

197. Green, N. M., Avidin. *Adv Protein Chem* **1975**, 29, 85-133.

198. Korpela, J. K.; Kulomaa, M. S.; Elo, H. A.; Tuohimaa, P. J., Biotin-binding proteins in eggs of oviparous vertebrates. *Experientia* **1981**, 37, (10), 1065-1066.

Cada subunidad presenta un sitio de unión para **biotina** o vitamina H que constituye el grupo prostético de un conjunto de enzimas denominado carboxilasas que participan en reacciones clave del metabolismo. Su nombre deriva del griego *bios* que significa vida. La interacción avidina-biotina tiene una constante de disociación del orden de 10^{-15} M, lo que hace que sea una de las interacciones proteína-ligando no covalente más fuerte que se conoce.

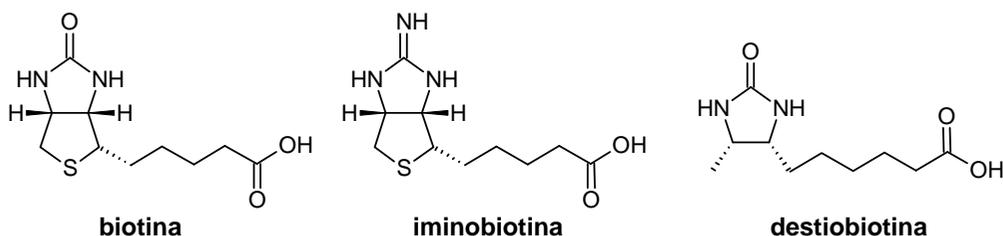


Figura 2.4. Estructura de la biotina, la iminobiotina y la desthiobiotina.

La avidina es una proteína muy básica, con un punto isoeléctrico en torno a 10, es estable en un amplio rango de pH y temperatura y, además, resiste condiciones extremas de desnaturalización¹⁹⁹. Cuando la biotina se encuentra unida a ella esta estabilidad es incluso mayor²⁰⁰. La especificidad de esta interacción es similar a la antígeno-anticuerpo, pero con una fortaleza superior ya que variaciones en la fuerza iónica, pH, la presencia de agentes desnaturalizantes o detergentes y temperaturas extremas no evitan que esta interacción tenga lugar²⁰¹. Se llega a afirmar que la interacción presenta la estabilidad de un enlace covalente sin serlo

Otra proteína estrechamente relacionada con la avidina es la **estreptavidina**²⁰². Se aísla de *Streptomyces avidinii* y al igual que la avidina es un tetrámero en el que cada subunidad posee un sitio de unión para biotina. Presenta una afinidad por biotina similar a la de la avidina aunque el peso molecular, la

¹⁹⁹. Green, N. M., Avidin .4. Stability at extremes of pH and dissociation into sub-units by guanidine hydrochloride. *Biochemical Journal* **1963**, 89, (3), 609.

²⁰⁰. Bayer, E. A.; EhrlichRogozinski, S.; Wilchek, M., Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin. *Electrophoresis* **1996**, 17, (8), 1319-1324.

²⁰¹. Ross, S. E.; Carson, S. D.; Fink, L. M., Effects of detergents on avidin-biotin interaction. *Biotechniques* **1986**, 4, (4), 350-354.

²⁰². Chaiet, L.; Wolf, F. J., Properties of streptavidin biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1964**, 106, (1-3), 1.

Capítulo 2

secuencia de aminoácidos y el punto isoeléctrico son diferentes. Además, no es una glicoproteína por lo que mediante su empleo se pueden evitar las interacciones no específicas que presenta la avidina. Las propiedades de la avidina y la estreptavidina se han mejorado a través de métodos químicos y recombinantes los cuales han permitido mejorar la estabilidad y/o controlar la unión a biotina. Así, por ejemplo, la neutravidina presenta una elevada selectividad de unión a biotina mientras que la nitravidina proporciona una unión a biotina que depende del pH, existiendo una fuerte interacción en condiciones ácidas (pH 4-5) y una disociación a pHs superiores.

El **interés biotecnológico**²⁰³⁻²⁰⁷ del sistema avidina-biotina reside en la alta especificidad, fortaleza y estabilidad de esta interacción, que ha dado lugar a multitud de aplicaciones en diferentes campos, por ejemplo, en fusión celular²⁰⁸, biosensor²⁰⁹, preparación de neoglicoproteínas²¹⁰ y en la producción de anticuerpos monoclonales²¹¹. Se ha aplicado también en el diagnóstico y tratamiento de tumores malignos²¹²⁻²¹⁴. Sin embargo, las principales áreas de aplicación de este sistema son la localización, aislamiento y diagnóstico.

203. Wilchek, M.; Bayer, E. A., The avidin biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* **1988**, 171, (1), 1-32.

204. Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Editors, *Methods in Enzymology, Vol. 184: Avidin-Biotin Technology*. 1990; p 746 pp.

205. Bayer, E. A.; Wilchek, M., The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods Biochem Anal* **1980**, 26, 1-45.

206. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Avidin-biotin immobilization systems. **1993**, 51-60.

207. D, S.; G, M.; S, D.; G, N.; S, M.; E., C., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*. Pierce Chemical Company: 1992; p 467.

208. Conrad, M. K.; Lo, M. M. S., Facilitated cell-fusion for hybridoma production. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 641-653.

209. Orth, R. N.; Clark, T. G.; Craighead, H. G., Avidin-biotin micropatterning methods for biosensor applications. *Biomedical Microdevices* **2003**, 5, (1), 29-34.

210. Chen, V. J.; Wold, F., Neoglycoproteins - preparation and properties of complexes of biotinylated asparagine-oligosaccharides with avidin and streptavidin. *Biochemistry* **1986**, 25, (4), 939-944.

211. Casali, P.; Inghirami, G.; Nakamura, M.; Davies, T. F.; Notkins, A. L., Human monoclonals from antigen-specific selection of lymphocytes-b and transformation by ebv. *Science* **1986**, 234, (4775), 476-479.

212. Urdal, D. L.; Hakomori, S., Tumor-associated ganglio-n-triosylceramide - target for antibody-dependent, avidin-mediated drug killing of tumor-cells. *Journal of Biological Chemistry* **1980**, 255, (21), 509-516.

213. Paganelli, G.; Malcovati, M.; Fazio, F., Monoclonal-antibody pretargeting techniques for tumor-localization - the avidin biotin system. *Nuclear Medicine Communications* **1991**, 12, (3), 211-234.

214. Sakahara, H.; Saga, T., Avidin-biotin system for delivery of diagnostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, 37, (1-3), 89-101.

2.2.2. Aplicaciones.

2.2.2.1. Cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad²¹⁵⁻²¹⁷ es una de las técnicas más importantes basadas en la interacción específica de moléculas inmovilizadas (fase estacionaria) con mezclas de biomoléculas (fase móvil) lo cual permite su análisis y/o purificación. La inmovilización de biotina sobre distintos soportes se ha utilizado, principalmente, para la purificación de avidina (nativa o conjugada), estreptavidina y anticuerpos anti-biotina. Por otro lado, la inmovilización de avidina, bien covalentemente o a través de su unión a columnas de biotina, permite la purificación de sistemas biotinilados. Un problema importante de esta tecnología, y sólo parcialmente resuelto, deriva paradójicamente de la elevada afinidad de la avidina por la biotina que hace que sea necesario utilizar condiciones extremas para romper la interacción de ambas moléculas, condiciones que implican usualmente el empleo de agentes desnaturizantes como SDS o clorhidrato de guanidinio y pH inferiores a 2, que no todos los sistemas son capaces de resistir. Para resolver este problema se ha propuesto el uso de iminobiotina²¹⁸ o destiobiotina²¹⁹ como ligando, ya que la avidina presenta una menor afinidad hacia ellas. Otra alternativa ha sido el uso de columnas que emplean avidina monomérica^{220,221} o avidina modificada²²².

215. Meany, D. L.; Xie, H. W.; Thompson, L. V.; Arriaga, E. A.; Griffin, T. J., Identification of carbonylated proteins from enriched rat skeletal muscle mitochondria using affinity chromatography-stable isotope labeling and tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2007**, 7, (7), 1150-1163.

216. Finn, F. M.; Titus, G.; Horstman, D.; Hofmann, K., Avidin biotin affinity-chromatography - application to the isolation of human placental insulin-receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1984**, 81, (23), 7328-7332.

217. Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. B., Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1968**, 61, (2), 636.

218. Heney, G.; Orr, G. A., The purification of avidin and its derivatives on 2-iminobiotin-6-aminoethyl-sepharose 4b. *Analytical Biochemistry* **1981**, 114, (1), 92-96.

219. Hirsch, J. D.; Eslamizar, L.; Filanoski, B. J.; Malekzadeh, N.; Haugland, R. P.; Beechem, J. M., Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. *Analytical Biochemistry* **2002**, 308, (2), 343-357.

220. Laitinen, O. H.; Nordlund, H. R.; Hytonen, V. P.; Uotila, S. T. H.; Marttila, A. T.; Savolainen, J.; Airene, K. J.; Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M. S., Rational design of an active avidin monomer. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (6), 4010-4014.

221. Henrikson, K. P.; Allen, S. H. G.; Maloy, W. L., Avidin monomer affinity column for the purification of biotin-containing enzymes. *Analytical Biochemistry* **1979**, 94, (2), 366-370.

222. Morag, E.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin. *Biochemical Journal* **1996**, 316, 193-199.

2.2.2.2. Localización.

La biotina es una molécula de pequeño tamaño de manera que su conjugación a biomoléculas no afecta a la estructura, a la conformación o a la funcionalidad de las mismas. Una vez marcada con biotina la molécula/sistema de interés, ésta puede ser localizada o detectada mediante el uso de avidina etiquetada con fluoróforos o enzimas. Así, mediante el empleo del sistema avidina-biotina se han llevado a cabo:

Estudios citoquímicos e histoquímicos^{223, 224}: La posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales y policlonales frente a prácticamente cualquier molécula permite utilizar este sistema (previa biotilización del anticuerpo) para la localización específica del correspondiente antígeno en la superficie celular, en el interior de la membrana plasmática, en el citoplasma, asociado al núcleo o en otro orgánulo subcelular.

Blotting²²⁵⁻²²⁷: La transferencia de muestras biológicas a membranas seguida de una detección específica es conocida como “*blotting*”. Esta técnica se utiliza en Bioquímica y Biología Molecular y es una herramienta en el diagnóstico clínico. El empleo del sistema avidina-biotina permite obtener sensibilidades mayores a las que se alcanzan con la tinción directa del gel.

223. Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Skutelsky, E., Affinity cytochemistry - localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes via avidin-biotin complex. *Febs Letters* **1976**, 68, (2), 240-244.

224. Bayer, E. A.; Skutelsky, E.; Wilchek, M., The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. *Methods Enzymol* **1979**, 62, 308-15.

225. Hurley, W. L.; Finkelstein, E.; Holst, B. D., Identification of surface-proteins on bovine leukocytes by a biotin-avidin protein blotting technique. *Journal of Immunological Methods* **1985**, 85, (1), 195-202.

226. Oshannessy, D. J.; Voorstad, P. J.; Quarles, R. H., Quantitation of glycoproteins on electroblots using the biotin - streptavidin complex. *Analytical Biochemistry* **1987**, 163, (1), 204-209.

227. Yoon, J. H.; Brooks, R.; Halper, J., Immunoblotting assays for keratan sulfate. *Analytical Biochemistry* **2002**, 306, (2), 298-304.

2.2.2.3. Diagnóstico.

Sondas genéticas^{228, 229}: Una sonda genética es un fragmento de ADN complementario a la secuencia que se pretende detectar y a la que se une de manera específica. La interacción se detecta a través del empleo de etiquetas radiactivas, moléculas fluorescentes o biotina. El empleo de sondas genéticas biotiniladas cada vez se está extendiendo más ya que proporciona niveles de sensibilidad similares a los que proporcionan las sondas radiactivas y, además, entrañan menor riesgo para la salud.

Inmunoensayos²³⁰⁻²³²: Se basan en la interacción antígeno-anticuerpo, aunque conceptualmente comparten analogías con las sondas genéticas.

Dada la naturaleza multivalente de la avidina se pueden establecer múltiples interacciones avidina-biotina que hacen que aumente considerablemente la sensibilidad de estos ensayos de localización y diagnóstico. Existen distintas configuraciones^{233,234}: **LAB** (“labeled avidin-biotin”), **BRAB** (“bridged avidin-biotin”) y **ABC** (“avidin-biotin complex”) que aparecen esquematizadas en la **figura 2.5**. En todos los casos se utiliza un anticuerpo o un ligando biotinilado y la diferencia entre ellas reside en la forma en la que la avidina interviene en el proceso de detección. En el ensayo BRAB el orden de adición, existiendo etapas de lavado entre uno y otro, es anticuerpo biotinilado-avidina-enzima biotinilada, sin embargo, en el caso

228. Asaeda, A.; Ide, H.; Terato, H.; Takamori, Y.; Kubo, K., Highly sensitive assay of DNA abasic sites in mammalian cells optimization of the aldehyde reactive probe method. *Analytica Chimica Acta* **1998**, 365, (1-3), 35-41.

229. Royston, M. E.; Augenlicht, L. H., Biotinated probe containing a long-terminal repeat hybridized to a mouse colon-tumor and normal tissue. *Science* **1983**, 222, (4630), 1339-1341.

230. Kendall, C.; Ionescumatiu, I.; Dreesman, G. R., Utilization of the biotin avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). *Journal of Immunological Methods* **1983**, 56, (3), 329-339.

231. Sin, K. K.; Chan, C. P. Y.; Pang, T. H.; Seydack, M.; Renneberg, R., A highly sensitive fluorescent immunoassay based on avidin-labeled nanocrystals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 384, (3), 638-644.

232. Dong, L. V.; Selvanayagam, Z. E.; Gopalakrishnakone, P.; Eng, K. H., A new avidin-biotin optical immunoassay for the detection of beta-bungarotoxin and application in diagnosis of experimental snake envenomation. *J Immunol Methods* **2002**, 260, (1-2), 125-36.

233. Guesdon, J. L.; Ternynck, T.; Avrameas, S., Use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1979**, 27, (8), 1131-1139.

234. Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H., Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques - a comparison between abc and unlabeled antibody (pap) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **1981**, 29, (4), 577-580.

Capítulo 2

del ensayo ABC la avidina y la enzima biotinilada se incuban previamente y se adicionan conjuntamente, lo que hace que, tal y como se muestra en la figura, la señal se amplifique. Los marcadores enzimáticos más comúnmente empleados son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina y la galactosidasa B.

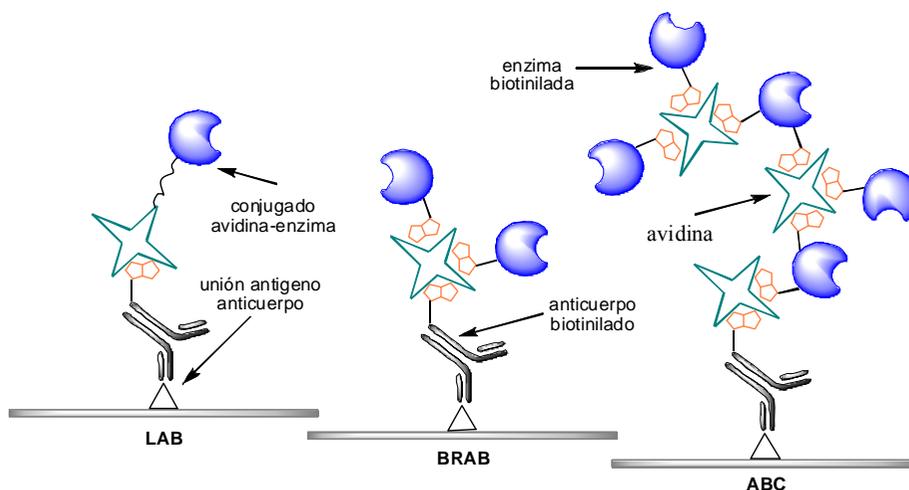


Figura 2.5. Configuraciones utilizadas en los inmunoensayos en los que se emplea el sistema avidina-biotina.

2.2.3. Ventajas e inconvenientes del sistema avidina-biotina.

El empleo del sistema avidina-biotina, además de aumentar la sensibilidad de los ensayos de localización y diagnóstico, es un sistema muy versátil que permite aunar diferentes aproximaciones experimentales. Así, por ejemplo, un mismo anticuerpo biotinilado puede ser utilizado en distintos tipos de estudios y ser detectado de muy diversas maneras, dependiendo del conjugado avidina-marcador que empleemos. Y viceversa, un conjugado avidina-sonda puede emplearse en la detección de cualquier molécula biotinilada.

La incorporación de biotina en el sistema en estudio es el primer paso para poder hacer uso de este sistema avidina-biotina para lo cual se han desarrollado diferentes metodologías. Es posible biotinilar prácticamente cualquier biomolécula en condiciones suaves y sin apenas variaciones en su actividad, de hecho existen

reactivos comerciales para este fin²³⁵. Mediante el empleo de este sistema se evita la necesidad de llevar a cabo acoplamientos proteína-proteína (excepto para la avidina), que en muchos casos son bastante tediosos sobre todo cuando se dispone de escaso material de partida (como ocurre con anticuerpos monoclonales).

Sin embargo, no todo son ventajas, también presenta algunos **inconvenientes**. La presencia de biotina endógena en el sistema en estudio puede ser un problema, aunque en la mayoría de los casos los niveles de biotina son muy bajos y no interfieren. El principal problema es la existencia de interacciones no específicas debidas a la basicidad de la avidina (pI en torno a 10) y a que se trata de una glicoproteína, por lo que puede interactuar con proteínas que reconozcan azúcares, como las lectinas. Este problema se puede evitar mediante el empleo de estreptavidina u otra proteína de unión a biotina, como el anticuerpo anti-biotina²³⁶. Además, y debido al gran interés de este sistema por sus aplicaciones, se han llevado a cabo modificaciones sobre estas proteínas (avidina-estreptavidina) para poder ampliar el campo de aplicación y poder desarrollar nuevas aplicaciones²³⁷.

2.3. Etiquetado fluorescente.

2.3.1. Aplicaciones.

El etiquetado fluorescente de biomoléculas es una herramienta de gran importancia en genómica y proteómica que se utiliza en la **detección y análisis de biomoléculas**²³⁸⁻²⁴⁰. Así, por ejemplo, en los ensayos FISH (*"fluorescence in situ*

235. Bayer, E. A.; Wilchek, M., Protein biotinylation. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, (Avidin-Biotin Technol.), 138-60.

236. Bagci, H.; Kohen, F.; Kuscuoglu, U.; Bayer, E. A.; Wilchek, M., Monoclonal anti-biotin antibodies simulate avidin in the recognition of biotin. *Febs Letters* **1993**, 322, (1), 47-50.

237. Laitinen, O. H.; Nordlund, H. R.; Hytonen, V. P.; Kulomaa, M. S., Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends in Biotechnology* **2007**, 25, (6), 269-277.

238. Giepmans, B. N. G.; Adams, S. R.; Ellisman, M. H.; Tsien, R. Y., Review - The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **2006**, 312, (5771), 217-224.

239. Miyawaki, A.; Sawano, A.; Kogure, T., Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biology* **2003**, S1-S7.

240. Waggoner, A., Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, 10, (1), 62-66.

hybridation”) se utilizan sondas genéticas etiquetadas con un fluoróforo y en FIA (inmunoensayo por fluorescencia) el sistema de detección es el antígeno marcado fluorescentemente. La detección mediante fluorescencia también se ha utilizado en estudios citoquímicos e histoquímicos y en la secuenciación de ADN²⁴¹. Además, el etiquetado fluorescente se utiliza como sistema de tinción para la electroforesis de proteínas²⁴² así como en las técnicas de “*blotting*”²⁴³.

Sin embargo, su potencial va más allá de la mera detección pasiva ya que técnicas como la polarización de fluorescencia^{244,245} (de la que hablaremos en el capítulo siguiente) y FRET^{246,247} (“*Fluorescence Resonance Energy Transfer*”, también denominada “*Föster Resonance Energy Transfer*”) permiten evaluar cambios conformacionales, interacciones entre proteínas o entre proteína y ligando. FRET es un fenómeno mediante el cual la energía de excitación de una molécula fluorescente (donante) se transfiere a otra molécula (aceptor), que puede o no ser fluorescente, sin la emisión de un fotón. Esta interacción se produce cuanto la longitud de onda de emisión del donante es muy próxima a la de excitación del aceptor y la eficiencia de la misma depende de la distancia entre ambos, lo que ha hecho que este fenómeno haya sido utilizado en el estudio de una gran variedad de fenómenos biológicos en los que cambia la distancia entre dos puntos(10-100 Å)²⁴⁸.

241. Soper, S. A.; Owens, C.; Lassiter, S.; Xu, Y.; Waddell, E., DNA sequencing using fluorescence detection. *Topics in Fluorescence Spectroscopy* **2003**, *7*, (DNA Technology), 1-68.

242. Patton, W. F., A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **2000**, *21*, (6), 1123-1144.

243. Pretty, K.; Hatleberg, G.; Berggren, K. N.; Ryan, D.; Kemper, C.; Haugland, R. P.; Patton, W. F., Green/red dual fluorescence detection of total protein and alkaline phosphate-conjugated probes on blotting membranes. *Electrophoresis* **2001**, *22*, (5), 896-905.

244. Jameson, D. M.; Seifried, S. E., Quantification of protein-protein interactions using fluorescence polarization. *Methods* **1999**, *19*, (2), 222-233.

245. Jameson, D. M.; Sawyer, W. H., Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. *Biochemical Spectroscopy* **1995**, *246*, 283-300.

246. Selvin, P. R., Fluorescence resonance energy-transfer. *Biochemical Spectroscopy* **1995**, *246*, 300-334.

247. Wu, P. G.; Brand, L., Resonance energy-transfer - methods and applications. *Analytical Biochemistry* **1994**, *218*, (1), 1-13.

248. Dosremedios, C. G.; Miki, M.; Barden, J. A., Fluorescence resonance energy-transfer measurements of distances in actin and myosin - a critical-evaluation. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **1987**, *8*, (2), 97-117.

Algunas de las **aplicaciones** que ha encontrado son:

- ✓ Estudios de estructura y conformación de proteínas^{249, 58}.
- ✓ Interacciones ligando-receptor²⁵⁰, proteína-proteína²⁵¹ o ADN-proteína²⁵², entre otras.
- ✓ Inmunoensayos²⁵³.
- ✓ Distribución espacial y asociación de complejos proteicos²⁵⁴.
- ✓ Estudio de procesos enzimáticos¹⁸⁷
- ✓ Ensayos de función de membranas²⁵⁵

Así, por ejemplo, Matayoshi y col. desarrollaron una metodología sencilla e ingeniosa para medir la actividad de la proteasa VIH mediante FRET²⁵⁶. La idea consiste en utilizar un polipéptido de pequeño tamaño funcionalizado en uno de los extremos con un aceptor no fluorescente y el otro con un fluoróforo donante (**figura 2.6.**) que la proteasa es capaz de hidrolizar.

249. Dosremedios, C. G.; Moens, P. D. J., Fluorescence resonance energy-transfer spectroscopy is a reliable ruler for measuring structural-changes in proteins - dispelling the problem of the unknown orientation factor. *Journal of Structural Biology* **1995**, 115, (2), 175-185.

250. Berger, W.; Prinz, H.; Striessnig, J.; Kang, H. C.; Haugland, R.; Glossmann, H., Complex molecular mechanism for dihydropyridine binding to l-type ca²⁺-channels as revealed by fluorescence resonance energy-transfer. *Biochemistry* **1994**, 33, (39), 11875-11883.

251. Tompa, P.; Batke, J., Fructose-1,6-bisphosphate aldolase preferentially associates to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a mixture of cytosolic proteins as revealed by fluorescence energy-transfer measurements. *Biochemistry International* **1990**, 20, (3), 487-494.

252. Heyduk, T.; Lee, J. C., Application of fluorescence energy-transfer and polarization to monitor Escherichia-coli camp receptor protein and lac promoter interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, 87, (5), 1744-1748.

253. Morrison, L. E., Time-resolved detection of energy-transfer - theory and application to immunoassays. *Analytical Biochemistry* **1988**, 174, (1), 101-120.

254. Adair, B. D.; Engelman, D. M., Glycophorin-a helical transmembrane domains dimerize in phospholipid-bilayers - a resonance energy-transfer study. *Biochemistry* **1994**, 33, (18), 5539-5544.

255. Pecheur, E. I.; Martin, I.; Ruyschaert, J. M.; Bienvenue, A.; Hoekstra, D., Membrane fusion induced by 11-mer anionic and cationic peptides: A structure-function study. *Biochemistry* **1998**, 37, (8), 2361-2371.

256. Matayoshi, E. D.; Wang, G. T.; Krafft, G. A.; Erickson, J., Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy-transfer. *Science* **1990**, 247, (4945), 954-958.

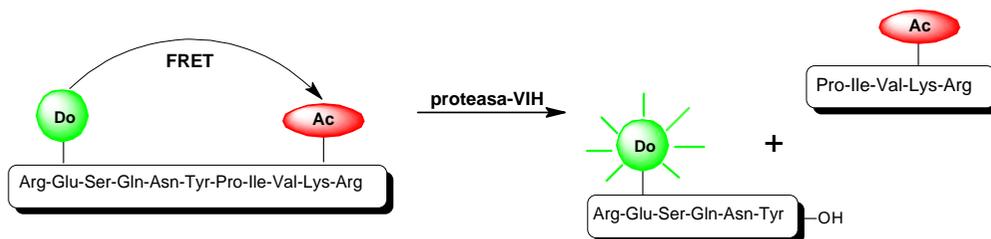


Figura 2.6. Ensayo de actividad para proteasa del VIH basado en FRET.

De manera que si la actividad proteasa se encuentra inhibida habrá FRET, sin embargo, si la proteasa es activa será capaz de hidrolizar al péptido lo que hará que la molécula donora recupere su fluorescencia. Esta metodología permite, además, estudiar inhibidores de esta actividad proteasa, con la gran importancia farmacológica que ello supone.

Otra de las aplicaciones del etiquetado fluorescente de biomoléculas, y en concreto de proteínas, ha sido el desarrollo de **biosensores** fluorescentes, los cuales constituyen un sistema ideal para el seguimiento de iones y moléculas con relevancia desde un punto de vista biológico tanto *in vivo* como *in vitro*^{257,258}. Esto se consigue gracias a la elevada selectividad y, en ocasiones, la elevada afinidad del centro activo de ciertas proteínas por su correspondiente ligando. La metodología más extendida para el desarrollo de estos biosensores consiste en la introducción en posiciones concretas de la proteína, a través de mutagénesis dirigida, de un residuo de cisteína que posteriormente es etiquetado selectivamente con un fluoróforo sensible al medio, como es el caso del dansilo, la cumarina o el acrilodan. Este etiquetado suele llevarse a cabo en el centro activo de la proteína o en sus proximidades de tal manera que cuando ésta reconoce a su ligando se produce un cambio en el entorno del fluoróforo que conduce a variaciones en su intensidad de fluorescencia permitiendo así la detección específica del sustrato.

257. Hellings, H. W.; Marvin, J. S., Protein engineering and the development of generic biosensors. *Trends in biotechnology* **1998**, 16, (4), 183-9.

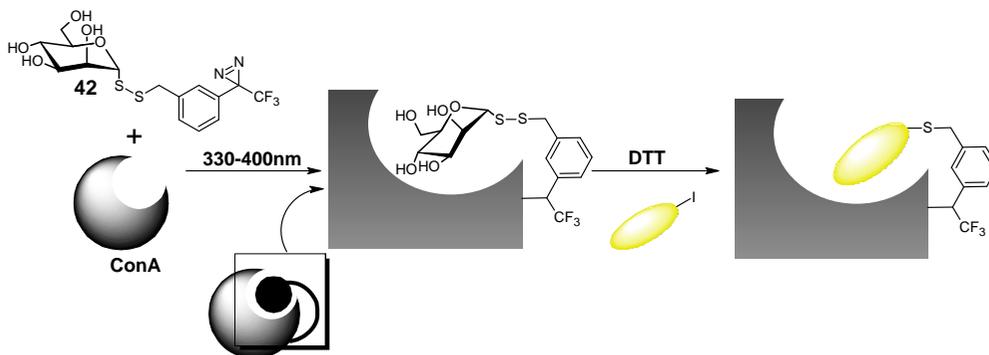
258. Giuliano, K. A.; Taylor, D. L., Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends in biotechnology* **1998**, 16, (3), 135-40.

Mediante esta estrategia se han desarrollado biosensores para O_2 ²⁵⁹, sulfatos²⁶⁰, ésteres de acil coenzima A²⁶¹, proteínas como las troponinas cardíacas²⁶², péptidos bisfosforilados²⁶³, aminoácido como la glutamina²⁶⁴ o azúcares como la glucosa²⁶⁵,²⁶⁶ o la maltosa²⁶⁷.

Pero la mutagénesis dirigida no es el único camino para el desarrollo de biosensores. Así, Shinkai y col.²⁶⁸⁻²⁷⁰ han desarrollado una metodología en la cual a través de métodos químicos introducen un grupo tiol en las cercanías del centro activo de la ConA el cual etiquetan selectivamente con un fluoróforo (**esquema 2.2.**).

-
- 259.** Zauner, G.; Strianese, M.; Bubacco, L.; Aartsma, T. J.; Tepper, A. W. J. W.; Canters, G. W., Type-3 copper proteins as biocompatible and reusable oxygen sensors. *Inorganica Chimica Acta* **2008**, 361, (4), 1116-1121.
- 260.** Shrestha, S.; Salins, L. L. E.; Ensor, C. M.; Daunert, S., Rationally designed fluorescently labeled sulfate-binding protein mutants: evaluation in the development of a sensing system for sulfate. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, 78, (5), 517-526.
- 261.** Wadum, M. C. T.; Villadsen, J. K.; Feddersen, S.; Moller, R. S.; Neergaard, T. B. F.; Kragelund, B. B.; Hojrup, P.; Faergeman, N. J.; Knudsen, J., Fluorescently labelled bovine acyl-CoA-binding protein acting as an acyl-CoA sensor: Interaction with CoA and acyl-CoA esters and its use in measuring free acyl-CoA esters and non-esterified fatty acids. *Biochemical Journal* **2002**, 365, (1), 165-172.
- 262.** Heyduk, E.; Dummit, B.; Chang, Y.-H.; Heyduk, T., Molecular Pincers: Antibody-Based Homogeneous Protein Sensors. *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)* **2008**, 80, (13), 5152-5159.
- 263.** Anai, T.; Nakata, E.; Koshi, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I., Design of a Hybrid Biosensor for Enhanced Phosphopeptide Recognition Based on a Phosphoprotein Binding Domain Coupled with a Fluorescent Chemosensor. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, (19), 6232-6239.
- 264.** Wada, A.; Mie, M.; Aizawa, M.; Lahoud, P.; Cass, A. E. G.; Kobatake, E., Design and Construction of Glutamine Binding Proteins with a Self-Adhering Capability to Unmodified Hydrophobic Surfaces as Reagentless Fluorescence Sensing Devices. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (52), 16228-16234.
- 265.** Ge, X.; Rao, G.; Tolosa, L., On the Possibility of Real-Time Monitoring of Glucose in Cell Culture by Microdialysis Using a Fluorescent Glucose Binding Protein Sensor. *Biotechnology Progress* **2008**, 24, (3), 691-697.
- 266.** Khan, F.; Gnudi, L.; Pickup, J. C., Fluorescence-based sensing of glucose using engineered glucose/galactose-binding protein: A comparison of fluorescence resonance energy transfer and environmentally sensitive dye labelling strategies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 365, (1), 102-106.
- 267.** Dattelbaum, J. D.; Looger, L. L.; Benson, D. E.; Sali, K. M.; Thompson, R. B.; Hellinga, H. W., Analysis of allosteric signal transduction mechanisms in an engineered fluorescent maltose biosensor. *Protein Science* **2005**, 14, (2), 284-291.
- 268.** Hamachi, I.; Nagase, T.; Shinkai, S., A General Semisynthetic Method for Fluorescent Saccharide-Biosensors Based on a Lectin. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (48), 12065-12066.
- 269.** Nagase, T.; Nakata, E.; Shinkai, S.; Hamachi, I., Construction of artificial signal transducers on a lectin surface by post-photoaffinity-labeling modification for fluorescent saccharide biosensors. *Chemistry--A European Journal* **2003**, 9, (15), 3660-3669.
- 270.** Nakata, E.; Nagase, T.; Shinkai, S.; Hamachi, I., Coupling a natural receptor protein with an artificial receptor to afford a semisynthetic fluorescent biosensor. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (2), 490-495.

Capítulo 2



Esquema 2.2. Etiquetado de la ConA en el centro activo.

El compuesto **42** contiene una unidad de manosa, que actúa como ligando, y un grupo fotoreactivo que va a permitir la unión covalente a la proteína, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro. Una vez que el ligando **42** se ha unido al centro activo de la ConA éste se une covalentemente mediante la acción de luz ultravioleta. Tras reducir el enlace disulfuro con ditioeritritol (DTT) el grupo tiol que queda libre se marca selectivamente, como en los casos anteriores, con un fluoróforo sensible al medio (**figura 2.7.**).

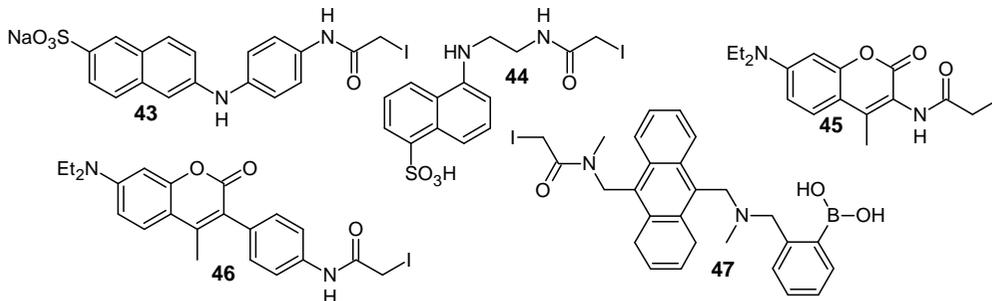


Figura 2.7. Iodoacetamidas fluorescentes utilizadas por Shinkai y col. en el etiquetado de la ConA.

En presencia de metil α -D-manopiranosido u otro azúcar reconocible por la ConA se produce una disminución en la intensidad de emisión del fluoróforo incorporado lo que indica una modificación del ambiente que rodea al mismo, en concreto está pasando de un medio menos polar a otro en el que la polaridad es mayor (**figura 2.8.**). Esta variación en la intensidad de fluorescencia permite emplear este sistema como sensor de azúcares reconocibles por los que la ConA.

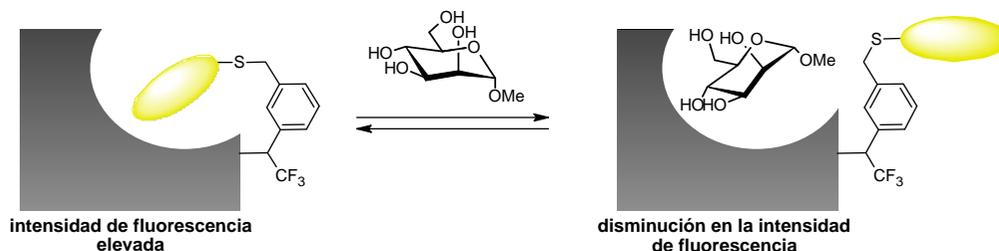


Figura 2.8. Reconocimiento de Me-man y efecto que este produce sobre la fluorescencia de la ConA marcada.

En el caso del compuesto **47** el grupo borónico interacciona con el azúcar dando lugar a un aumento en la intensidad de fluorescencia del mismo, en lugar de una disminución como ocurre en el resto de los casos.

2.3.2. Ventajas del etiquetado fluorescente.

Las **ventajas** del etiquetado fluorescente frente a otros métodos convencionales como el azul coomassie, la plata, el oro coloidal o la radiactividad son las siguientes:

- ✓ Detección rápida y sensibilidad elevada: cada etiqueta fluorescente puede originar del orden de 10^7 - 10^8 fotones por segundo.
- ✓ Versatilidad: distintos etiquetados originan distintos “colores” siendo posible realizar un etiquetado “policromático” como el empleado, por ejemplo, en la secuenciación de ADN.
- ✓ Inerte: el tamaño y las propiedades del fluoróforo raramente interfieren con la biomolécula marcada.
- ✓ Localización de la señal en el punto de etiquetado, a diferencia de lo que ocurre en el etiquetado enzimático.
- ✓ Es posible utilizar distintos parámetros, intensidad, polarización de fluorescencia, tiempo de vida, espectro de emisión o excitación, así como la variación de los mismos, lo que multiplica sus posibles aplicaciones.

2.4. Discusión y resultados.

Algunas de las derivatizaciones empleadas en proteómica y genómica para el etiquetado de biomoléculas presentan importantes limitaciones como la falta de estabilidad en medios acuosos o en las condiciones de reacción, una reactividad moderada o la necesidad de varias etapas para llevar a cabo el etiquetado. Las vinilsulfonas constituyen una alternativa atractiva por su reactividad frente a grupos presentes en las macromoléculas, tales como aminas y tioles. Dada nuestra experiencia anterior en la glicosidación de proteínas mediante el empleo de glicosil vinilsulfonas²⁷¹ nos propusimos llevar a cabo la síntesis de diversos sistemas conteniendo un fluoróforo, biotina o ambos simultáneamente para el etiquetado de biomoléculas, más concretamente para el etiquetado de proteínas, dada la importancia de la biotinización y el marcaje fluorescente de las mismas, como acabamos de comprobar en la introducción.

2.4.1. Síntesis de agentes de etiquetado sencillos.

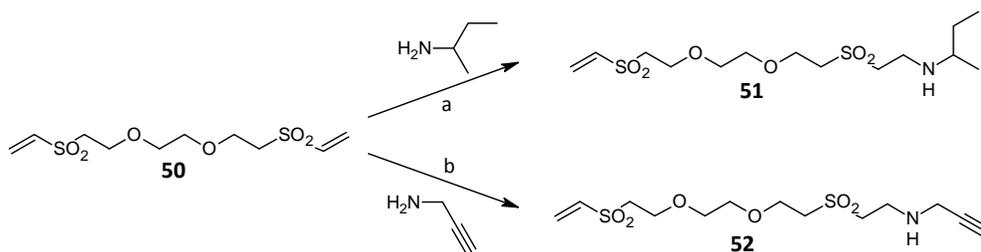
Para la consecución de estos objetivos es necesario obtener vinilsulfonas convenientemente derivatizadas, con uno o dos grupos funcionales adicionales, para la unión de los correspondientes agentes de etiquetado. Para el caso particular de la biotina, como contiene un grupo carboxilo, se planteó la unión de este resto a través de un enlace amida via cloruro de ácido, para lo cual es necesaria la presencia de un grupo amino. Ya que las vinilsulfonas reaccionan con aminas primarias para dar lugar a aminas secundarias se llevó a cabo la reacción de una bis-vinilsulfona con una amina primaria, de tal manera que en un solo paso tendríamos dentro de la misma molécula un grupo vinilsulfona que nos permitiría la unión a la biomolécula y una amina secundaria que podría reaccionar con el grupo carboxilo de la biotina (**esquema 2.3.**).

271. Pérez-Balderas, F. Empleo de cicloadiciones 1,3-dipolares y adiciones tipo Michael como nuevas metodologías para la síntesis de neoglicoconjugados multivalentes. Estudio de afinidad con lectinas. Universidad de Granada, 2005.

Capítulo 2

vinilsulfona. En otras proporciones y con otros disolventes (THF, acetonitrilo) aparece turbidez. Al llevar a cabo la reacción de la sec-butilamina con la bisvinilsulfona **50** se pudo observar por c.c.f. la aparición de dos productos, uno con $R_f = 0.22$ que es el producto deseado **51** y el otro que no se ha llegado a identificar y que en realidad es una mezcla de varios productos. Se trabajó con un exceso de bisvinilsulfona y se fue variando el tiempo de reacción, pero en ningún caso se dejó que la amina se consumiera del todo ya que a medida que transcurría el tiempo la cantidad de producto deseado iba desapareciendo. En las condiciones óptimas el compuesto **51** se obtiene con un rendimiento del 57%.

Como otro de los objetivos consistía en la síntesis de agentes de etiquetado con una doble funcionalización se planteó la posibilidad de utilizar como amina primaria la propargil amina. En nuestro grupo se había observado previamente²⁷¹ que esta amina no es tan reactiva frente a vinilsulfonas como otras aminas primarias por lo que se evitaría el problema que habíamos tenido con, por ejemplo, la etanolamina, además introducimos en el sistema un grupo propargilo que nos permite llevar a cabo reacciones de CuAAC, en las que el grupo ha trabajado extensamente^{20,70,273-275}. La reacción de **50** con propargilamina permite obtener el compuesto **52** con un rendimiento del 51%.



Esquema 2.5. Condiciones: Cl₂CH₂:2-propanol (2:1), t.a., (a) 6 horas, 57%; (b) 1 día, 52%.

273. Ortega-Munoz, M.; Morales-Sanfrutos, J.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Giron-Gonzalez, M. D.; Sevillano-Tripero, N.; Salto-Gonzalez, R.; Santoyo-Gonzalez, F., Click multivalent neoglycoconjugates as synthetic activators in cell adhesion and stimulation of monocyte/macrophage cell lines. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, 5, (14), 2291-2301.

274. Morales-Sanfrutos, J.; Ortega-Munoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of Calixarene-Based Cavitands and Nanotubes by Click Chemistry. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, (19), 7768-7771.

275. Morales-Sanfrutos, J.; Ortega-Munoz, M.; Lopez-Jaramillo, J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of Molecular Nanocages by Click Chemistry. *Journal of Organic Chemistry* **2008**, 73, (19), 7772-7774.

De esta manera obtenemos un compuesto difuncional **51** y otro trifuncional **52** con grupos que son ortogonales entre sí, circunstancia que permite modular su reactividad para la incorporación en primer lugar del agente o los agentes de etiquetado y en segundo lugar la unión a la biomolécula a través de la función vinilsulfona. La amina de los compuestos **51** y **52** puede reaccionar con distintos cloruros de ácido y también con cloruros de sulfonilo, en concreto se ha llevado a cabo la reacción con los derivados que aparecen en la **figura 2.9**.

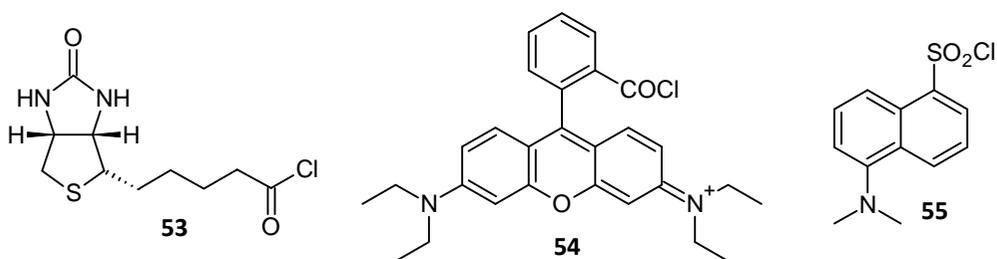
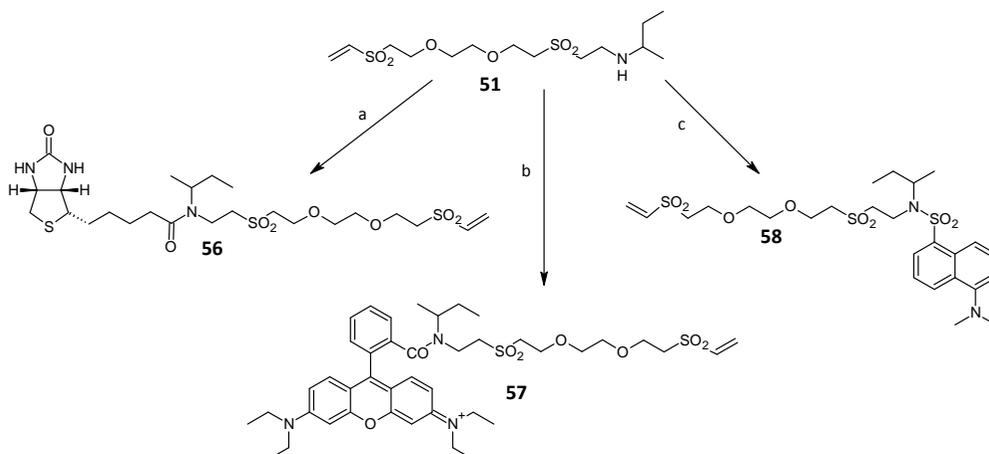


Figura 2.9. Cloruros empleados.

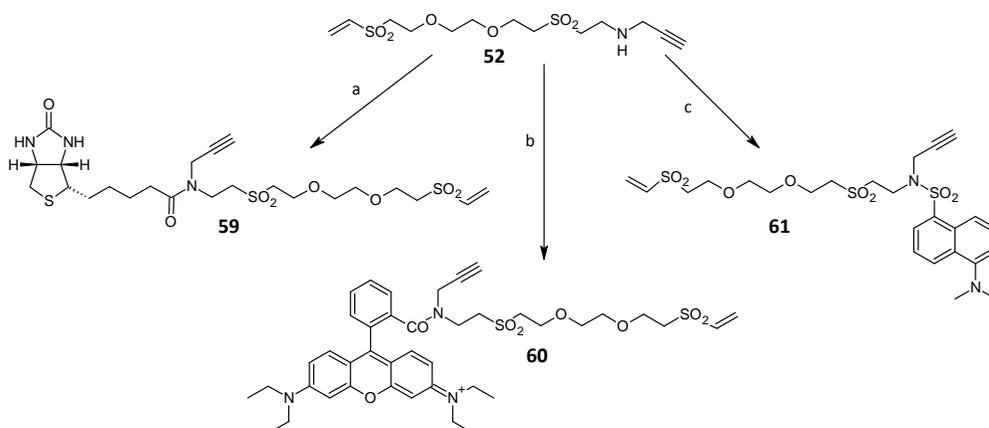
El cloruro de dansilo **55** es comercial y el cloruro de ácido de la biotina **53** y de la rodamina **54** se obtienen a partir de los correspondientes ácidos, que son comerciales, por tratamiento con Cl₂SO. El acoplamiento con la amina se lleva a cabo en THF anhidro y utilizando Et₃N como base. En el caso del cloruro de dansilo se observó que cuando la reacción se lleva a cabo en acetonitrilo los tiempos de reacción disminuyen y aumentaban los rendimientos. La reacción de la aminovinilsulfona **51** con los cloruros de ácido **53**, **54** y **55** conduce a la formación de las correspondientes vinilsulfonas **56**, **57** y **58** con rendimientos de moderados a buenos (**esquema 2.6**).

Capítulo 2



Esquema 2.6. Condiciones: Et₃N, THF anhidro, t.a., 10min (a) **53**, 63%; (b) **54**, 44%; (c) **55**, Et₃N, CH₃CN anhidro, t.a., 2.5 días, 74%.

Cuando se emplea como amino-vinilsulfona el compuesto **52** se obtienen las alquino-vinilsulfonas **59**, **60** y **61** con buenos a excelentes rendimientos (**esquema 2.7.**).



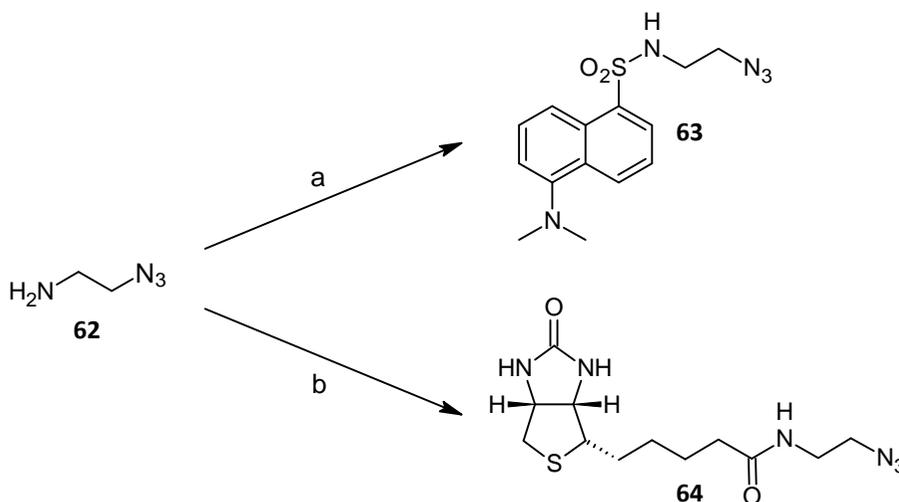
Esquema 2.7. Condiciones: Et₃N, THF anhidro (a) **53**, 92%; (b) **54**, 86%; (c) **55**, Et₃N, CH₃CN anhidro, t.a., 2 días, 84%.

Mediante este procedimiento se obtienen una serie de compuestos de marcaje simple (**56**, **57** y **58**) y otros que siendo simples (**59**, **60** y **61**) presentan un grupo propargilo que permite llevar a cabo reacciones de CuAAC sobre ellos.

2.4.2. Síntesis de agentes de etiquetado doble.

En el apartado anterior se describió la obtención de una serie de compuestos (**59**, **60** y **61**) que, además de contener una molécula de biotina o un fluoróforo, presentan un grupo propargilo que permite introducir una nueva etiqueta a través de reacciones de CuAAC, obteniéndose de esta manera compuestos que contienen simultáneamente dos agentes de marcaje diferentes.

En primer lugar, es necesario obtener azido-derivados de las etiquetas que se quieren introducir. En concreto se llevó a cabo la síntesis de los azido-derivados de dansilo **63**²⁷⁶, biotina **64**²⁷⁷ y fluoresceína **67**. Los azido-derivados del dansilo y la biotina se obtienen por reacción del correspondiente cloruro con 2-azido etilamina²⁷⁸ (esquema 2.8.).



Esquema 2.8. Condiciones: (a)**55**, CH₂Cl₂ anhidro, Et₃N, t.a., 15min, 96%; (b)**53**, CH₃CN anhidro, Et₃N, t.a., 15min, 73%

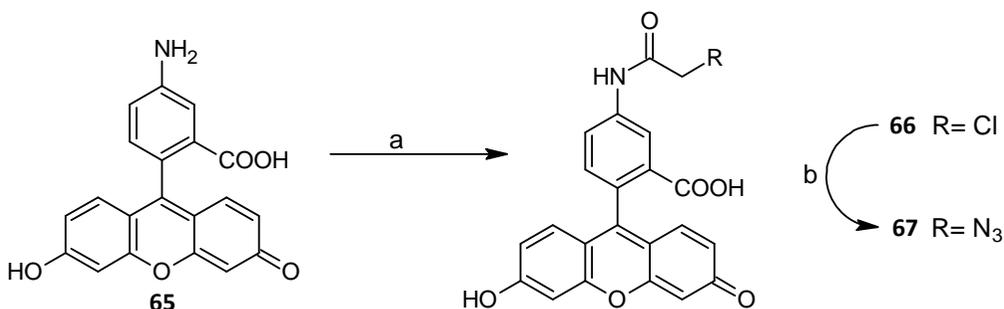
276. Inverarity, I. A.; Hulme, A. N., Marked small molecule libraries: a truncated approach to molecular probe design. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, (4), 636-643.

277. Meier, J. L.; Mercer, A. C.; Rivera, H.; Burkart, M. D., Synthesis and evaluation of bioorthogonal pantetheine analogues for in vivo protein modification. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, (37), 12174-12184.

278. Hahn, F. E.; Langenhahn, V.; Pape, T., Template synthesis of tungsten complexes with saturated N-heterocyclic carbene ligands. *Chemical Communications* **2005**, (43), 5390-5392.

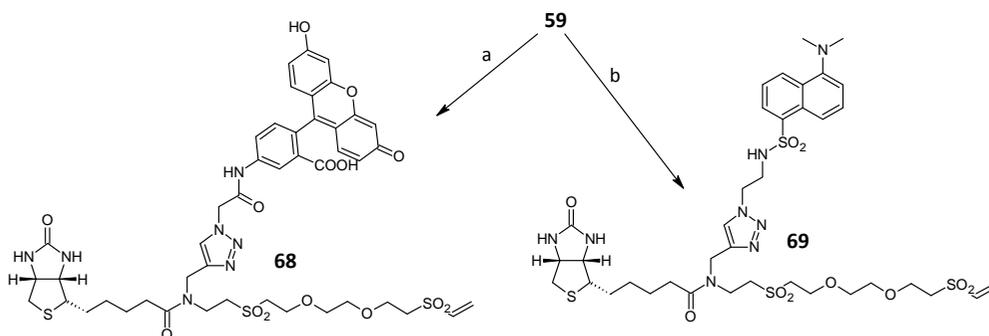
Capítulo 2

Para el azido-derivado de la fluoresceína se parte de las fluoresceinamina comercial **65** y se hace reaccionar con anhídrido cloroacético dando lugar a derivado clorado **66** que por sustitución nucleofila con azida sódica conduce a la obtención del azido-derivado **67** (esquema 2.9.).

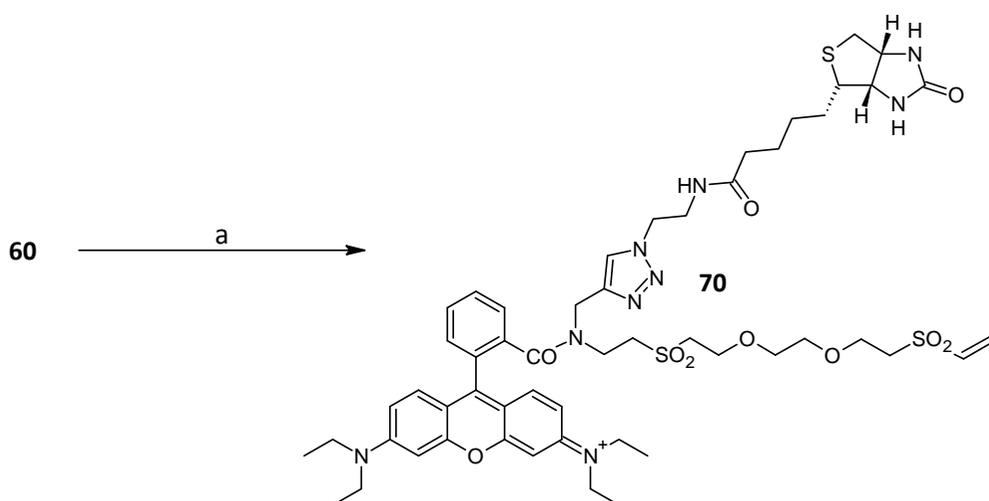


Esquema 2.9. Condiciones: (a) MeOH, anhídrido cloroacético, t.a., 1 día, 80% (b) MeOH, NaN₃, M.W. (500W, 65°C, 10 horas), 82%.

A continuación, para la obtención de los compuestos de marcaje con dos etiquetas diferentes, se llevó a cabo la reacción del compuesto **59** (biotina-propargilo) con los azido-derivados **63** y **67** (esquema 2.10) y del compuesto **60** (rodamina-propargilo) con el azido derivado de la biotina **64** (esquema 2.11.). Estas reacciones se llevaron a cabo en metanol, dada la baja solubilidad de los derivados de biotina en otros disolventes, y a temperatura ambiente (t.a.) para favorecer la reacción con el alquino, que es más reactivo, pues el doble enlace de la vinilsulfona también es susceptible de sufrir cicloadiciones 1,3-dipolares con azidas. Como catalizador se ha utilizado el complejo (EtO)₃P·CuI²⁰ y adicionamos Et₃N para facilitar la reacción. En todos los casos las reacciones finalizaron en cortos periodos de tiempo (3.5 horas) y los compuestos deseados se obtuvieron con buenos rendimientos (70-90%). En ningún caso se observó la reacción del azido con el doble enlace de la vinilsulfona.

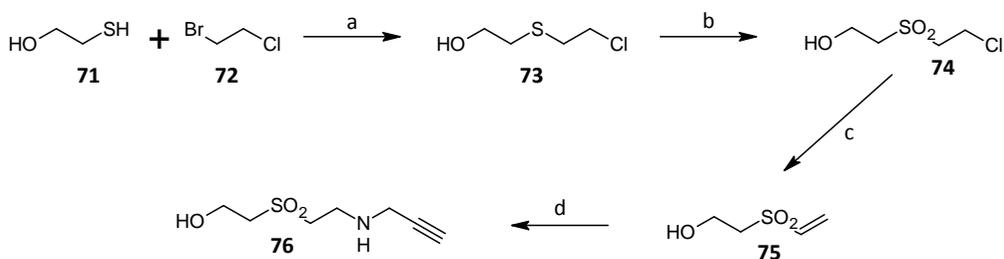


Esquema 2.10. Condiciones: $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, Et_3N , MeOH , t.a., 3.5 horas (a) **67**, 70%; (b) **63**, 90%.



Esquema 2.11. Condiciones: (a) **64**, $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, Et_3N , MeOH , t.a., 3.5 horas, 72%.

Para conseguir agentes de etiquetado con una menor longitud del espaciador nos propusimos el siguiente esquema sintético (**esquema 2.12.**).



Esquema 2.12. Condiciones: (a) Cs_2CO_3 , CH_3CN , t.a., Ar, 16 horas, 76%; (b) AcOH , H_2O_2 , t.a., 1 día, 76%; (c) Et_3N , THF , 1.5 horas, 81%; (d) propargilamina, THF :2-propanol (1:2), t.a., 1 día, 96%.

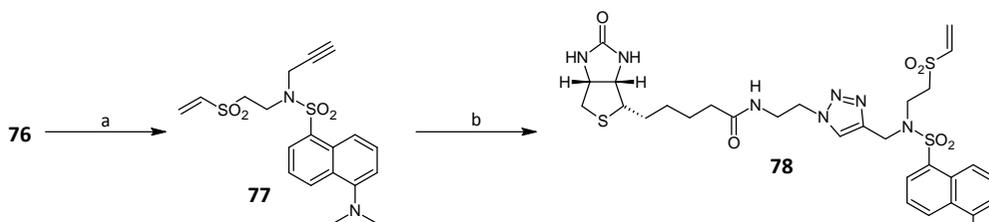
Capítulo 2

En primer lugar se llevó a cabo la reacción de mercaptoetanol con un exceso de bromocloroetano a t.a. en acetonitrilo anhidro y atmósfera de argón, utilizando Cs_2CO_3 como base. De esta manera se obtuvo **73**²⁷⁹ con un 76% de rendimiento. La oxidación de este tioéter con peróxido de hidrógeno en ácido acético permite obtener la correspondiente sulfona **74**²⁸⁰ con un 63% de rendimiento, que por tratamiento con Et_3N conduce a la obtención de la vinilsulfona **75**²⁸⁰, con un rendimiento del 81%. El compuesto **75** es una vinilsulfona que al igual que en los casos anteriores se puede funcionalizar con propargilamina y que además posee un grupo β -hidroxietil a partir del cual se puede generar una nueva función vinilsulfona. La reacción de **75** con propargilamina en cantidades casi equimoleculares en THF-2-propanol 1:2 origina **76**, con un 96% de rendimiento, tras un día de reacción a t.a.

Para introducir uno de los agentes de etiquetado y, simultáneamente, generar la vinilsulfona se llevó a cabo la reacción de **76** con un exceso de cloruro de dansilo (3 moles) y Et_3N (6 moles). El cloruro de dansilo reacciona con la amina para dar lugar a una sulfonamida, que es muy estable, y con el grupo hidroxilo dando lugar a un sulfonato que es un buen grupo saliente y en un medio básico, como el que tenemos en la reacción, genera la vinilsulfona. Utilizamos como disolvente Cl_2CH_2 y tras un día de reacción a t.a. se obtuvo el compuesto **77** con un 68% de rendimiento. La reacción de CuAAC de este último compuesto con el azido-derivado de la biotina **64**, en las mismas condiciones utilizadas en los casos anteriores, conduce a la formación del agente de etiquetado doble **78** con excelentes rendimientos (**esquema 2.13.**). La única diferencia entre este compuesto **78** y el **69**, es la longitud del espaciador que contiene a la vinilsulfona.

279. Rao, M. K.; Sharma, M.; Raza, S. K.; Jaiswal, D. K., Synthesis, characterization and mass spectrometric analysis of cysteine and valine adducts of sulphur mustard. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **2003**, 178, (3), 559-566.

280. Black, R. M.; Brewster, K.; Harrison, J. M.; Stansfield, N., The chemistry of 1,1'-thiobis-(2-chloroethane) (sulfur mustard) .1. Some simple derivatives. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **1992**, 71, (1-4), 31-47.



Esquema 2.13. Condiciones: (a) **55**, Et₃N, CH₂Cl₂ anhidro, t.a., 1 día, 68%; (b) **64**, (EtO)₃P-CuI, Et₃N, MeOH, t.a., 2 horas, 92%.

2.4.3. Etiquetado de proteínas empleando los sistemas de etiquetado sencillo.

Se analizó la potencialidad de estos compuestos en el etiquetado de biomoléculas, y en concreto en el etiquetado de proteínas, sobre un conjunto de proteínas modelo. La elección de las proteínas modelo se llevó a cabo en base a su disponibilidad y variedad en términos de peso molecular, punto isoeléctrico, estructura cuaternaria, número de grupos reactivos y modificaciones postransduccionales. En la siguiente tabla se resumen las principales características de las proteínas seleccionadas.

proteína	oligómero	P.M. (kDa)	grupos reactivos	pI
BSA	monómero	67	H17+K56+1C Total=77	5.6
Avidina(monómero)	tetrámero	17	H1+K9 Total=10	9.5
ConA(monómero)	tetrámero	26.6	H6+K12 Total=18	5.3

Tabla 2.1.: Características de las proteínas que se han utilizado. H = histidina, K = lisina y C = cisteína.

En primer lugar se ensayaron los agentes de etiquetado simple **56** (biotina), **57** (rodamina) y **58** (dansilo). De los reactivos de marcaje se prepararon disoluciones con una concentración de 15 mg/mL en una mezcla de DMSO:H₂O al 50%. En estas condiciones tanto el compuesto **56** como el **57** se disuelven sin problemas, sin embargo la disolución de **58** queda turbia, a pesar de que se sonicó.

Capítulo 2

En la **tabla 2.2.** se recoge la estequiometría (moles de proteína (monómero) por moles de reactivo de marcaje) utilizada en el etiquetado.

proteína/ compuesto	estequiometría
BSA-biotina(56)	1:5 1:10
Avidina-dansilo(58)	1:4 1:8
ConA-rodamina(57)	1:5 1:10

Tabla 2.2.: Estequiometría utilizadas en el marcaje

Las disoluciones se incubaron a 37°C durante 1 día y a las 3, 8 y 24 horas se tomaron alícuotas de 50 µL que se combinaron con un volumen igual de tampón de carga de electroforesis para finalizar la reacción. Transcurridas las 24 horas de reacción las muestras se dializaron a temperatura ambiente frente a tampón HEPES 10 mM pH 8. Finalizada la diálisis las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5min y se recogieron los sobrenadantes.

Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE (12% poliacrilamida). En la **figura 2.10.** aparecen de derecha a izquierda la avidina con **58** en una estequiometría 1:4 a las 3, 8 y 24 horas y las siguientes calles son ConA marcada con **57** en una estequiometría 1:5 a las 3, 8 y 24 horas. En el caso del sistema avidina-**58** entre las 8 y las 24 horas se observa un ligero cambio en la intensidad de fluorescencia de la proteína marcada, aunque donde se observa más claramente que la reacción continúa tras 8 horas es en el reactivo de marcaje (frente), cuya señal desaparece a las 24 horas. Para el caso de la ConA-**57** a partir de las 8 horas no se observan cambios ni en la intensidad de fluorescencia de la proteína ni en la del exceso de reactivo de marcaje lo cual no quiere decir que tras 8 horas la reacción no continúe. En este caso la señal que proporciona la rodamina es tan intensa que no nos permite apreciar a simple vista las posibles variaciones que pueden existir.

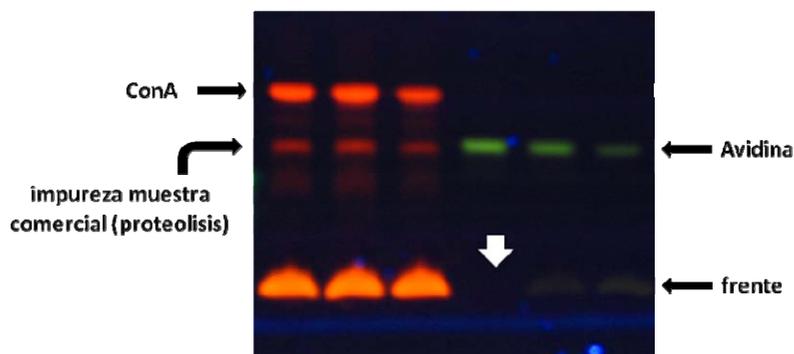


Figura 2.10. Gel (SDS-PAGE) iluminado con un transiluminador λ 365nm. De derecha a izquierda: Avidina-58 (1:4) 3, 8 y 24 horas; ConA-57 (1:5) 3, 8 y 24 horas.

En las siguientes figuras (**figuras 2.11. y 2.12.**) se recogen dentro del mismo gel las dos estequiometrías utilizadas para cada proteína así como los distintos tiempos que se han utilizado. El análisis del efecto de la estequiometría sobre la intensidad de marcaje revela que altas estequiometrías provocan precipitación, que es masiva para ConA. Además, al registrar los espectros de fluorescencia de la avidina para las dos estequiometrías (**figura 2.13.**) se observa que la mayor estequiometría no sólo provoca precipitación, sino que además conduce a una intensidad de fluorescencia similar.

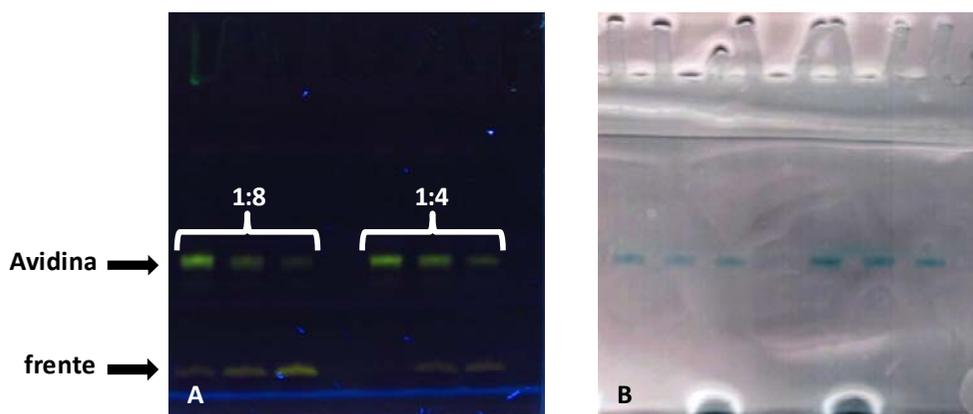


Figura 2.11. Gel (SDS-PAGE) avidina-58; de derecha a izquierda: estequiometría 1:4/ 3, 8 y 24 horas; estequiometría 1:8/3, 8 y 24 horas. **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm para detectar fluorescencia; **B)** Teñido con coomassie para detectar cantidad de proteína.

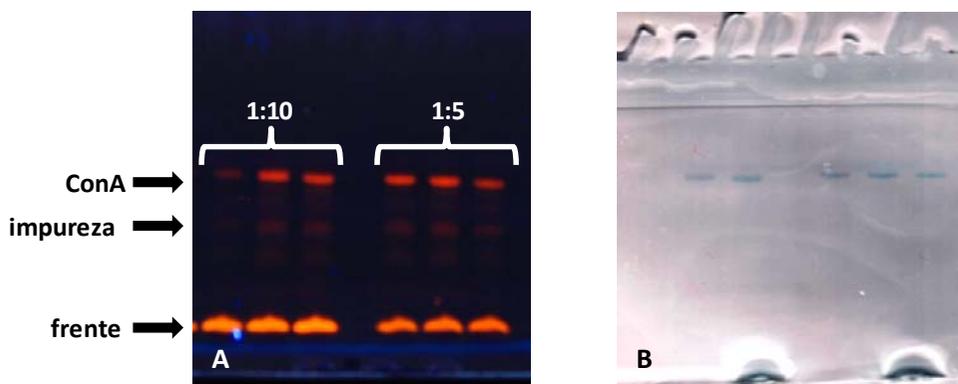
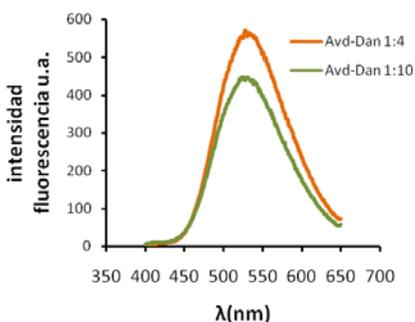


Figura 2.12. Gel (SDS-PAGE) ConA-57; de derecha a izquierda: estequiometría 1:5/ 3, 8y 24 horas; estequiometría 1:10/3, 8 y 24 horas. **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm para detectar fluorescencia; **B)** Teñido con coomassie para detectar cantidad de proteína.



MUESTRA	[PROTEÍNA] μM	INTENSIDAD FLUORESCENCIA
Avd-Dan 1:4	0.91	565
Avd-Dan 1:8	1	446

Figura 2.13. Espectros de emisión de fluorescencia de la avidina marcada tras excitar a 335nm. La concentración de proteína se estableció mediante Bradford²⁸¹.

Para analizar el efecto del marcaje sobre la funcionalidad de las proteínas se estudió la interacción BSA-56 con avidina-58. Como se reseñó en la introducción del capítulo, la avidina es una proteína muy estable, y esta estabilidad es incluso mayor cuando se encuentra unida a la biotina²⁰⁰, por lo que la interacción avidina-biotina puede ser detectada mediante SDS-PAGE ya que no es destruida en unas condiciones de desnaturalización suaves. Para el caso particular de nuestro sistema modelo, la interacción de la avidina fluorescente con BSA-biotina originará un desplazamiento hacia zonas de peso molecular alto.

²⁸¹. Bradford, M. M., Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, (1-2), 248-254.

Se incubaron 7.5 μ L de avidina-**58** (1:8) con BSA-**56** 1:5 y 1:10 y estequiometrías avidina-**58** (tetrámero, que es la unidad funcional):BSA-**56** T:1 y T:4 en tampón HEPES 33mM pH 8 durante 30 minutos, transcurridos los cuales se añadió tampón de carga y la muestra resultante se calentó 2 minutos a 100°C (condiciones de desnaturalización suaves).

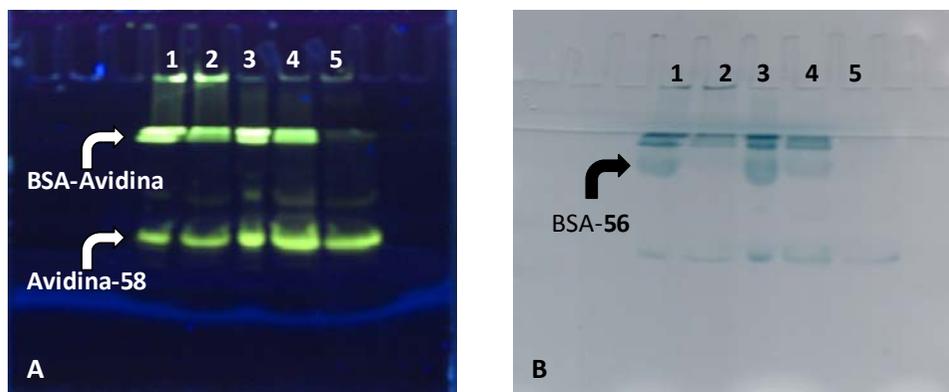


Figura 2.14. Gel (SDS-PAGE) avidina-**58** (A58):BSA-**56** (B56); de izquierda a derecha: 1.- A58: B56 (1:10) estequiometría T:4, 2.- A58: B56 (1:10) estequiometría T:1, 3.- A58: B56 (1:5) estequiometría T:4, 4.- A58: B56 (1:5) estequiometría T:1 y 5.- A58 control. **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm para detectar fluorescencia; **B)** Teñido con comassie para detectar cantidad de proteína.

En la **figura 2.14.A** se puede observar que se produce un incremento en la fluorescencia a pesos moleculares elevados, de hecho esos conjugados ni siquiera pasan al gel separador. Este incremento es más acusado en los casos en los que se utiliza una estequiometría avidina-**58**:BSA-**56** mayor (calles 1 y 3). Además, en el caso de la BSA marcada con **56** en una proporción 1:10 (calles 1 y 2) aparecen complejos de mayor peso molecular que no llegan a entrar en el gel concentrador. Cuando se repite el experimento y se emplean condiciones de desnaturalización más drásticas (100°C durante 5 minutos) se destruye totalmente la interacción (**figura 2.15.**).



Figura 2.15. Gel avidina-**58** (A58):BSA-**56** (B56) iluminado con transiluminador λ 365nm; de derecha a izquierda: BSA-**57**, A58 control, A58:B56 (1:5) estequiometría T:1, AD:BB (1:5) estequiometría T:4, A58:B56 (1:10) estequiometría T:1, A58:B56 (1:10) estequiometría T:4 y BSA-**57**.

2.4.4. Etiquetado de proteínas empleando los sistemas de etiquetado doble.

En este caso se utilizaron dos peroxidasa diferentes, la peroxidasa de rábano picante (HRP) y la peroxidasa de alcachofa (PA). Las peroxidasa son enzimas que catalizan reacciones bisustrato de carácter redox, utilizando un peróxido como oxidante (a lo que deben su nombre) y un segundo sustrato de características reductoras que es oxidado por el peróxido. Estas enzimas tienen numerosas aplicaciones en técnicas inmunoquímicas y de diagnóstico clínico debido a su gran estabilidad y sencillez para detectarlas por métodos colorimétricos utilizando un gran número de reactivos. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasa como enzima acoplada. También se utiliza en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el herpesvirus. La elección de estas enzimas como sistemas modelo se basa en su interés biotecnológico y en que su biotilización es un requisito previo para poderlas utilizar en la tecnología biotina-avidina como sistema de detección.

Se estudió el marcaje de estas proteínas con el compuesto **68** a diferentes estequiometrias y a dos temperaturas (22°C y 37°C). Se partió de una disolución de enzima, tanto de HRP como de PA, de 2 mg/mL en tampón HEPES 100mM pH 8.5 y una disolución de **68** de 25mM en DMSO, y se trabajó a diferentes estequiometrias (moles proteína:moles reactivo de marcaje, **tabla 2.3**).

Clave	Estequiometria
HRP10-PA10	1:10
HRP20-PA20	1:20
HRP30-PA30	1:30
HRP40-PA40	1:40
HRP50-PA50	1:50

Tabla 2.3. Estequiometria de reacción (moles de proteína: moles de reactivo de marcaje).

Tras una noche de reacción, tanto a 22°C como a 37°C, se tomaron alícuotas de 20µL y se les adicionaron 10µL de tampón de carga para parar la reacción. Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE. Como muestra la **figura**

2.16. tanto la estequiometría como la temperatura a la cual se lleva a cabo el marcaje (a t.a. no hay figuras porque la señal era muy tenue) ejercen un profundo efecto. En ambas proteínas se observa una mayor intensidad de fluorescencia, y por lo tanto una mayor eficiencia de etiquetado, al aumentar tanto la estequiometría como la temperatura, de hecho para la PA no se observa marcaje en el gel, a simple vista, cuando la reacción se lleva a cabo a t.a. A diferencia de lo que ocurría con la ConA y la avidina en las cuales al aumentar la estequiometria se observaba una precipitación de proteína, en este caso, incluso para la mayor estequiometria (1:50) no se produce esta precipitación.

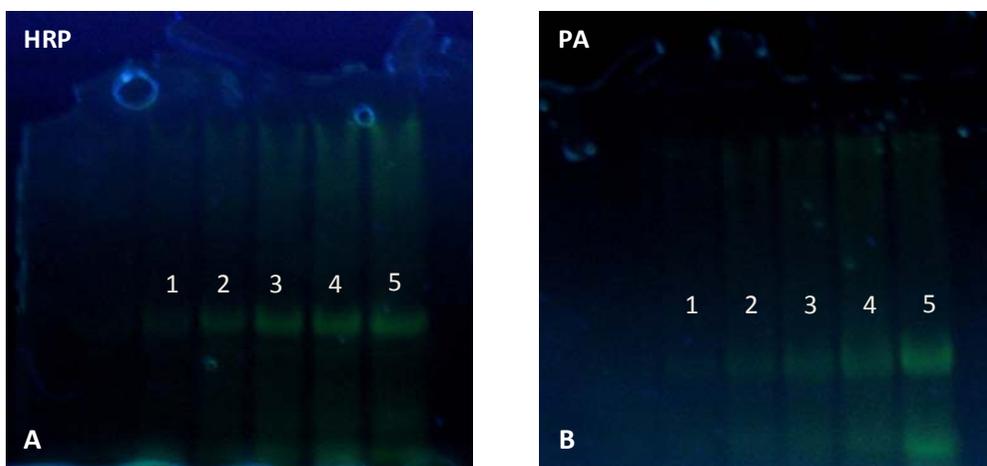


Figura 2.16. Geles (SDS-PAGE) iluminados con transiluminador λ 365nm. **A)** De izquierda a derecha 1-HRP10, 2-HRP20, 3-HRP30, 4-HRP40 y 5-HRP50, todas a 37°C. **B)** 1-PA10, 2-PA20, 3-PA30, 4-PA40 y 5-PA50, todas a 37°C.

Después de comprobar que las mejores condiciones de reacción para ambas enzimas era de 37°C y alta estequiometría, y dado que la HRP se marca más que la PA se llevó a cabo de nuevo el etiquetado con **68** a dos estequiometrias (1:25 y 1:50) y a 37°C e incluimos un nuevo agente de etiquetado, el **70**. Se preparó una disolución de HRP de 2 mg/mL en HEPES 100 mM pH 8.5 a la que se adicionaron los compuestos **68** y **70** disueltos en DMSO a una concentración de 25 mM.

Clave	Estequiometria
HRP-25-68	1:25
HRP-50-68	1:50
HRP-25-70	1:25
HRP-50-70	1:50

Tabla 2.4. Estequiometria de reacción (moles de proteína:moles de reactivo de marcaje).

Las disoluciones resultantes se incubaron a 37°C durante 24 horas, transcurridas las cuales las muestras se dializaron a t.a. frente a tampón PBS 50 mM pH 7.5 NaCl 100 mM. A lo largo de 5 días se realizan hasta 8 cambios de tampón. En la diálisis se incluyó también una muestra de peroxidasa sin marcar.

Los resultados se analizan mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la **figura 2.17.** al aumentar la estequiometría, tanto para **68** como para **70**, aumenta la intensidad de fluorescencia de la enzima marcada.

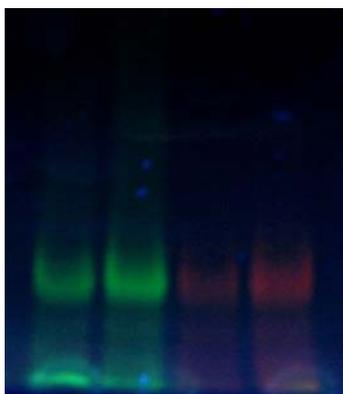


Figura 2.17. Gel (SDS-PAGE) iluminado con transiluminador λ 365nm. De derecha a izquierda HRP-70 estequiometria 1:50 y 1:25, HRP-68 estequiometria 1:50 y 1:25.

Para evaluar la influencia del marcaje sobre la actividad de la HRP se midió la actividad específica de las proteínas marcadas y sin marcar. Los resultados para las distintas muestras se recogen en la **tabla 2.5.**

Agente de etiquetado	Estequiometria	Concentración mg/mL	Actividad específica	% de actividad
ninguno	ninguna	1,74	5845	100
68	1:25	2,03	3571	61
68	1:50	2,15	3373	58
70	1:25	1,63	4445	76
70	1:50	1,49	3977	68

Tabla 2.5. Concentración de proteína, determinada mediante Bradford, y actividad de las distintas muestras.

Aunque en todos los casos se produce una reducción de la actividad enzimática, como era de esperar, esta se mantiene en unos niveles aceptables, del 60% hacia arriba. En ambos casos, tanto para **68** como para **70** la actividad se reduce más al aumentar la cantidad de agente de etiquetado utilizada.

Tras confirmar que las enzimas marcadas mantienen la actividad, procedimos a comprobar que la biotina incorporada covalentemente a la proteína a través del agente de etiquetado **68** o **70** era reconocida por avidina. Para ello se incubó avidina comercial sobre una placa para ELISA y tras lavar y bloquear con BSA se adicionaron cantidades decrecientes de todas las proteínas, incluyendo la que no se había marcado. Tras volver a lavar los pocillos se revelaron y únicamente se observó color en aquellos casos en los que se había depositado HRP etiquetada, en las filas G y H donde se había depositado HRP sin marcar no se observa color (**figura 2.18.**).

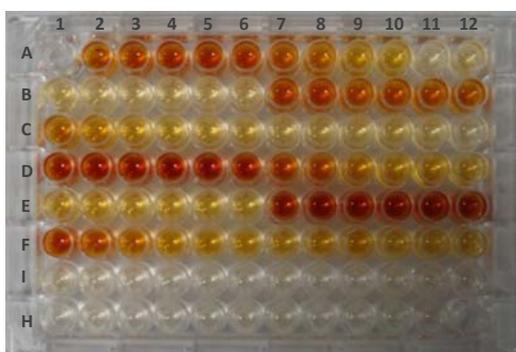


Figura 2.18. Calle A1: blanco, calles A2-B6: diluciones seriadas de HRP-25-**68** calles B7-C12: diluciones seriadas de HRP-50-**68**, calles D1-E6: diluciones seriadas de HRP-25-**70**, calles E7-F12: diluciones seriadas de HRP-25-**70**, calles G1-H6: HRP sin marcar y calles H7-H12: blanco.

Para ver si la longitud del espaciador tiene alguna influencia sobre el rendimiento en el etiquetado y el reconocimiento posterior de la biotina se marcó

Capítulo 2

de nuevo HRP con los agentes de etiquetado doble **69** y **78** los cuales contienen dansilo y biotina, siendo la única diferencia la longitud de la cadena donde se encuentra el grupo vinilsulfona. Al igual que en el ensayo anterior, se partió de una disolución de HRP de 2 mg/mL en HEPES 100 mM pH 8.5 y se le adicionó los compuestos **69** y **78** disueltos en DMSO (estequiometría 1:50). En ambos casos se observa una precipitación que no es de proteína sino del agente de etiquetado, siendo más acusada en el caso del compuesto de cadena larga **69**. La reacción se llevó a cabo a 37°C y debido a la precipitación observada se tomaron alícuotas de la reacción tras las 24, 48 y 72 horas para comprobar si en este caso, al no ser solubles los compuestos, era necesario un tiempo de reacción mayor. Todas las disoluciones se dializaron frente a tampón PBS 50 mM pH 7.5 NaCl 100 mM.

Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE. No se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia al aumentar el tiempo de reacción. Para el etiquetado con el compuesto **78** la HRP presenta una mayor intensidad de fluorescencia, lo que implica una mayor eficiencia en el etiquetado, posiblemente debido a la mayor solubilidad del agente de etiquetado **78** con respecto a **69**.

Para comprobar que la biotina incorporada a través de los agentes de etiquetado **69** y **78** era reconocida por avidina se llevó a cabo el mismo ensayo sobre placa ELISA que para los compuestos **68** y **70** y el resultado se muestra en la **figura 2.19**. En ambos casos la biotina es reconocida por avidina, de manera que aunque en el caso de **78** sea menor la longitud del espaciador no imposibilita el reconocimiento por parte de la avidina. Además, aunque no se determinó en qué porcentaje, la peroxidasa sigue siendo activa.

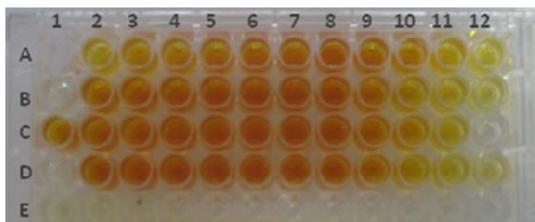


Figura 2.19. Calle A1: blanco, calles A2-A12: diluciones seriadas de HRP-**78**/24 horas, calle B1: blanco, calles B2-B12: diluciones seriadas de HRP-**69** /24 horas, calles C1-C11: diluciones seriadas de HRP-**78**/48 horas, calles C12-D1: blanco, calles D2-D12: diluciones seriadas de HRP-**69** /48 horas y calles E1-E11: HRP sin marcar.

2.4.5. Aplicación del reactivo rodamina-vinilsulfona **57 como sistema de tinción previo a la electroforesis.**

Durante los experimentos realizados con los compuestos que contenían rodamina (**57** y **70**) se observó que algunas muestras, si la cantidad de proteína cargada en el pocillo era lo suficientemente elevada, eran incluso visibles durante la electroforesis. Para valorar la viabilidad del marcaje fluorescente con **57** como sistema de tinción previo a la electroforesis se llevaron a cabo una serie de experiencias que se detallan a continuación.

Experiencia 1.

A una disolución de BSA (150 μg) en tampón HEPES pH 8.8 se le adicionaron 30 μg de **57**. Esta disolución se incubó a 100°C y se extrajeron alícuotas de 50 μL a los 10, 20 y 30 min a las que se añadieron 50 μL de tampón de carga. Para la electroforesis se cargaron 4 μL (0.74 μg) y se observó que el BSA se marca y es perfectamente visible, sin embargo, para tiempos de reacción largos empieza a darse agregación.

Experiencia 2.

Se estudiaron tiempos de reacción más cortos (2, 5 y 10 minutos) y concentraciones de **57** más bajas (la muestra de BSA se trató con 3 μg). Se comprueba que la cantidad de fluoróforo es importante, ya que para la misma cantidad de proteína en ambos experimentos se observa una menor intensidad de fluorescencia, y el tiempo de reacción también, debiendo ser al menos de 5 minutos.

Para establecer la sensibilidad de este sistema de tinción se analizó la fluorescencia de 0.5 μg y 0.25 μg de BSA del experimento anterior. Además se incluyeron en el gel las mismas cantidades de BSA sin marcar para ver si el etiquetado fluorescente afecta o no al patrón de migración de la proteína (**figura 2.20.**).

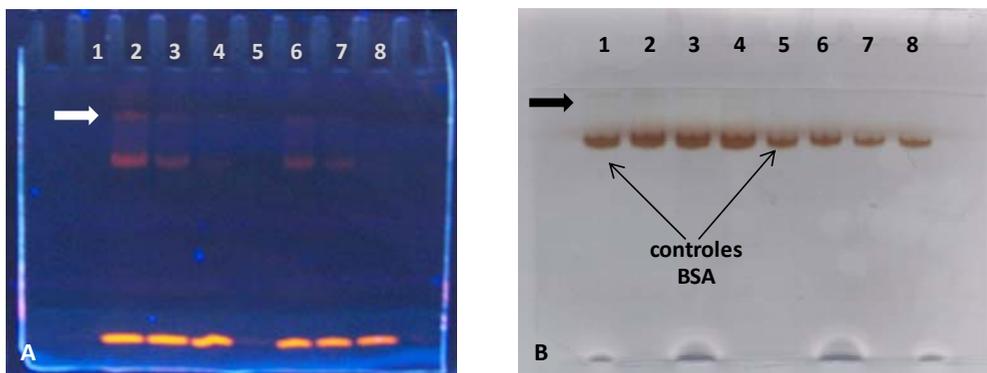


Figura 2.20. Tinción de BSA con 2 μ L de **57** (1.5 mg/mL). De izquierda a derecha 0.5 μ g de control de BSA y tiempos de reacción de 10, 5 y 2 min (calles 1, 2, 3,y 4), 0.25 μ g de control de BSA y tiempos de reacción de 10, 5 y 2 min (calles 5, 6, 7 y 8). **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm; para detectar la fluorescencia; **B)** Teñido con plata, para detectar la proteína.

A la vista de estas figuras se puede afirmar que el marcaje con **57** no altera el patrón de migración del BSA en SDS-PAGE. Además, se puede observar que para 5 minutos de reacción el límite de detección es del orden de 0.25 μ g y algo menor para 10 minutos de reacción. Estas señales de fluorescencia se mantienen en el gel aunque se incube en solución fijadora (40% metanol, 10% acético, 50% agua) durante 24 horas. La banda superior que aparece en la calle correspondiente a 0.5 μ g de BSA marcada durante 10 minutos de reacción (primera calle del gel de la izquierda) está también presente en el control de BSA visualizado mediante tinción de plata (primera calle del gel de la izquierda), por lo que no es un artefacto producto de la reacción, sino algo inherente a la proteína.

Experiencia 3.

A raíz de los resultados obtenidos con BSA se pensó en la posibilidad de utilizar el compuesto **58** como sistema de tinción ya que este compuesto contiene dansilo, el cual se excita a 335nm y el transiluminador que utilizamos emite a 365nm. Además, se incluyó una nueva proteína, la lisozima, que a diferencia del BSA es una proteína básica de bajo peso molecular (14kDa). A una disolución de proteína, BSA o lisozima (33 μ g) en tampón HEPES 120 mM pH 8.8 se le adicionaron 3 μ g de **57** o **58** La disolución final se incubó durante 10 minutos a 100°C, transcurridos los cuales se tomaron 50 μ L y se le adicionaron 100 μ L de tampón de carga, dando lugar a una concentración final de proteína de 50 ng/ μ L. Para la electroforesis (**figura 2.21.**) se cargaron 5 y 2.5 μ L (250 y 125ng respectivamente).

En concreto de izquierda a derecha tenemos 5 μ L de BSA-**57**, lisozima-**57**, BSA-**58**, lisozima-**58** y 2.5 μ L de BSA, lisozima, BSA-**57**, lisozima-**57**, BSA-**58** y lisozima-**58**.

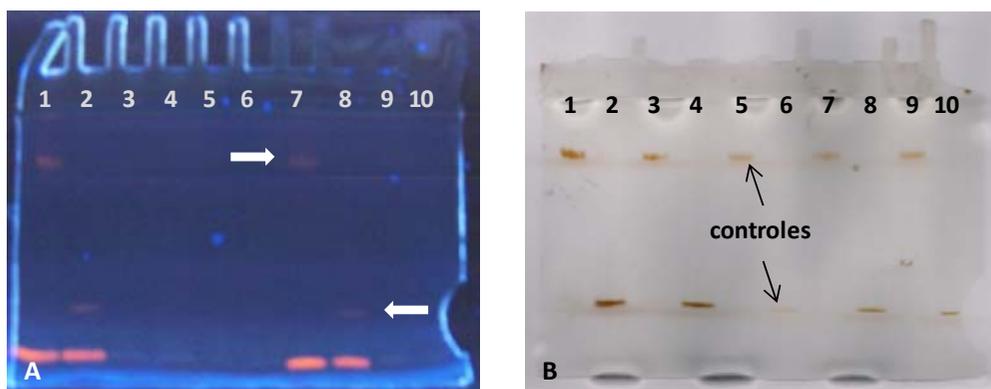


Figura 2.21. Tinción de BSA y lisozima con 2 μ L de **57** o **58** (1.5mg/ml). De izquierda a derecha: 250ng de BSA-**57** (1), lisozima-**57** (2), BSA-**58** (3), lisozima-**58** (4) y 125ng de BSA (5), lisozima (6), BSA-**57** (7), lisozima-**57** (8), BSA-**58** (9) y lisozima-**58** (10). **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm para detectar la fluorescencia; **B)** Teñido con plata, para detectar la proteína.

En el caso del compuesto **58** no se observa ningún tipo de señal, independientemente de la proteína, y este hecho no parece atribuible a una precipitación de la muestra, ya que en la tinción con plata no se observan grandes diferencias en la cantidad de proteína con uno u otro fluoróforo. Aunque de forma muy tenue, mediante el empleo del reactivo **57** somos capaces de detectar del orden de 125 ng de ambas proteínas y, además, en ninguno de los casos se altera el patrón de migración de las proteínas.

Experiencia 4.

Para generalizar aun más este sistema de tinción se llevó a cabo el marcaje de un extracto de vegetal tanto con **58** como con **57**. A tres disoluciones de extracto vegetal (52 μ g) en tampón HEPES pH 8.8 se le adicionaron 3, 6 y 9 μ g de **57** y **58**. Las disoluciones se mantuvieron a 100°C durante 10 minutos y a continuación se le adicionan 30 μ L de tampón de carga. Además, también se marcó un estándar de pesos moleculares.

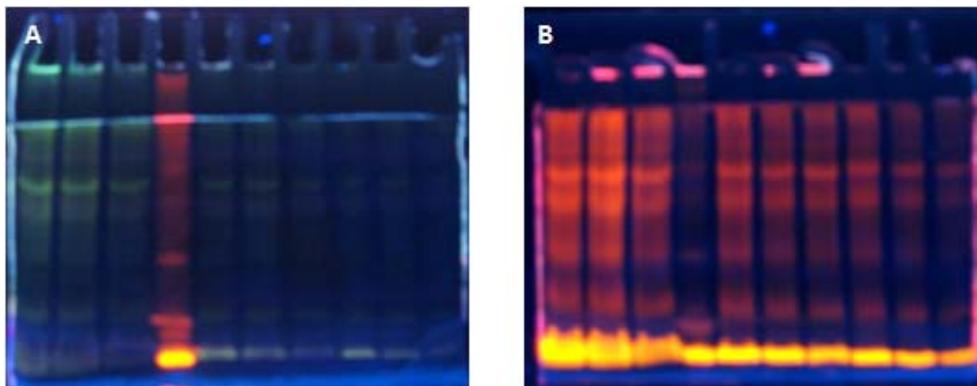


Figura 2.22. Tinción de un extracto vegetal con **57** y **58**

Tal y como habíamos observado en el caso anterior aquí se confirma que el compuesto **58**, que contiene dansilo, es un sistema de tinción bastante peor que **57**. Aunque para la **57** podemos ver en el gel que en todos los casos tenemos un exceso de reactivo este exceso es necesario ya que se observa una mayor intensidad de fluorescencia al añadir 6 μ L que al añadir 4 μ L, y esta a su vez es mayor que la que presenta el extracto cuando se marca con 2 μ L.

2.4.6. Estudio de selectividad.

Por último, dadas las muchas referencias en las que se indica la selectividad que presentan las vinilsulfonas hacia los grupos tiol^{142, 144} frente a los grupos amino, y el interés que esta selectividad tiene en el etiquetado de biomoléculas se estudió la selectividad de estos compuestos y se eligió como ejemplo la vinilsulfona **57**. Como proteína modelo se escogió la BSA ya que contiene un número impar de residuos de cisteína lo que nos asegura que al menos uno de ellos no se encuentra formando puentes disulfuro. Se prepararon dos disoluciones de BSA y una de ellas se trató con bromoetanol para bloquear los grupos tiol. Las disoluciones se mantuvieron a temperatura ambiente durante una noche y a continuación se adicionó a ambas, la tratada con bromoetanol y la que no, el compuesto **57**. A los 5, 15 y 30 minutos de reacción se tomaron alícuotas de 25 μ L que se bloquean con 10 μ L de β -mercaptoetanol. Tras una hora se añadieron 25 μ L de tampón de carga y de esta disolución final se cargaron 8 μ L en los geles. En la **figura 2.23**. se puede ver que el marcaje es menos significativo en aquellas muestras que se trataron con bromoetanol y en las cuales, en principio, no existen residuos cisteína con los que el agente de etiquetado pueda reaccionar.

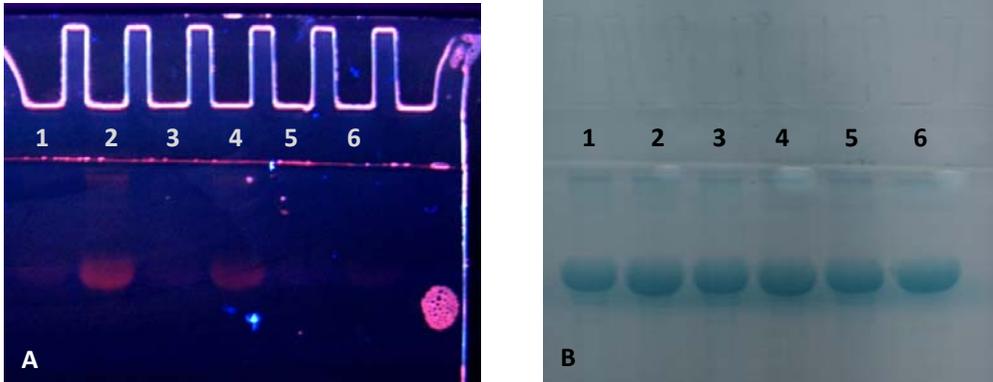


Figura 2.23: De izquierda a derecha: BSA bloqueada con bromoetanol(1) y sin bloquear(2)/30 minutos de reacción, BSA bloqueada con bromoetanol(3) y sin bloquear(4)/15 minutos de reacción y BSA bloqueada con bromoetanol(5) y sin bloquear(6)/5 minutos de reacción. **A)** Iluminado con un transiluminador a λ 365nm para detectar fluorescencia; **B)** Teñido con coomassie para detectar proteína.

2.5. Conclusiones.

Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficaz para la síntesis de agentes de etiquetado de biomoléculas conteniendo una o dos etiquetas y se ha demostrado la aplicabilidad de las reacciones de CuAAC en la síntesis de este tipo de sistemas. Además se ha puesto de manifiesto la potencialidad del grupo vinilsulfona como grupo reactivo para la unión covalente de estos sistemas a proteínas de distinta naturaleza. Esta derivatización presenta además las siguientes ventajas:

- ✓ Estabilidad.
- ✓ La reacción es rápida y con altos rendimientos, no generándose ningún tipo de subproducto.
- ✓ Las reacciones se llevan a cabo en ausencia de catalizadores por simple mezcla de los reactivos.
- ✓ Las reacciones pueden llevarse a cabo bajo condiciones fisiológicas: medio acuoso, rango de pH estrecho, temperaturas suaves y sin necesidad de usar co-solventes
- ✓ Los procesos de purificación son sencillos.
- ✓ Tolerancia hacia otros grupos funcionales presentes en las biomoléculas distintos de los grupos amino y tiol, con los que reaccionan las vinilsulfonas.

Con respecto al empleo de este tipo de sistemas en el etiquetado de proteínas las conclusiones son:

Condiciones de reacción: tanto el tiempo de reacción como la estequiometría proteína:fluoróforo están claramente influenciados por la naturaleza de la proteína. En el caso de las peroxidasas, tanto para la HRP como para la PA, se observa una dependencia mayor y además reaccionan bastante peor que otras proteínas como la avidina y la BSA. En el caso de la ConA aunque el etiquetado es eficiente, este provoca una precipitación de la misma.

Modificación de la actividad/función: a pesar de las modificaciones ni la avidina pierde capacidad para reconocer a la biotina ni las peroxidasas se inactivan, aunque para el caso de la HRP se ha podido comprobar que al aumentar la fluorescencia, y por tanto la eficiencia del etiquetado, disminuye la actividad específica de la proteína. La biotinización del BSA con **56** y de HRP con **69** y **78** pone de manifiesto que la longitud del espaciador entre la vinilsulfona y la biotina,

incluso en el caso de **78** donde esta distancia es bastante pequeña, es suficiente para permitir el posterior reconocimiento por avidina de las proteínas biotiniladas con estos compuestos.

De los diferentes fluoróforos utilizados se concluye que la rodamina es el mejor, pues desde la perspectiva de su aplicabilidad a) buena fluorescencia en el transiluminador, b) buena solubilidad en agua, c) compatibilidad con un posterior tinción con comassie o plata, d) la sensibilidad que proporciona es del orden de 125 ng de proteína, e) en SDS no modifica el patrón de migración de las proteínas modelo BSA y lisozima y f) es capaz de marcar un amplio rango de proteínas.

En el caso de la BSA se ha demostrado que para tiempos de reacción cortos, es decir, al menos desde un punto de vista cinético, estos compuestos son selectivos de grupos tiol frente a grupos amino.

2.6. Sección experimental.

Materiales y métodos generales

Las cromatografías en capa fina (c.c.f.) fueron realizadas sobre hojas de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄ marca Merck, utilizando para el revelado luz ultravioleta, una disolución de ninhidrina en etanol (0.3% w/v), una disolución de ácido sulfúrico en etanol (10% v/v) o una disolución de permanganato potásico en agua (1% w/v). La purificación de los productos obtenidos se llevó a cabo mediante cromatografía en columna de presión, utilizando sílica gel marca Merck (230-400 mesh, ASTM). Los puntos de fusión se midieron en un aparato de punto de fusión Gallekamp y no están corregidos. Las medidas de rotación óptica fueron realizadas en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 a temperatura ambiente. Los espectros de infrarrojos se registraron en equipos Mattson FTIR modelo Satellite. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se realizaron a temperatura ambiente en aparatos Bruker AM300 y AM400 o Varian Direct Drive (300MHz, 400MHz, 500MHz y 600MHz). Los desplazamientos químicos de los espectros de ¹H-RMN se expresan en ppm, utilizando como referencia interna TMS ($\delta = 0.0$ ppm) y CHCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm) para las disoluciones en CDCl₃, DMSO ($\delta = 2.50$ ppm) para las disoluciones en DMSO-d₆ y MeOH ($\delta = 3.305$ ppm) para las disoluciones en MeOD-d₄. Los valores de las constantes de acoplamiento se dan en Hz. Los desplazamientos químicos de ¹³C-RMN son expresados en ppm empleando como referencia interna la señal de CDCl₃ ($\delta = 77.0$ ppm), DMSO-d₆ ($\delta = 39.5$) o MeOD-d₄ ($\delta = 49.0$ ppm). Los espectros de masas FAB han sido realizados en un aparato Fissons VG Autospec-Q utilizando como matrices tioglicerol, glicerol o ácido dihidroxibenzoico, los espectros de masa MALDI-TOF fueron realizados utilizando un aparato Bruker modelo Autoflex utilizando como matriz DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) o HCCA (ácido α -ciano-4-hiroxicinamico). Todos los disolventes anhidros fueron preparados siguiendo procedimientos descritos²⁸². Todos los reactivos empleados así como los disolventes fueron de alta pureza y se adquirieron a diferentes marcas comerciales (Aldrich, Sigma, Flucka, Merck...).

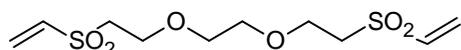
Las electroforesis²⁸³ se llevaron a cabo mediante un equipo BIO RAD PowerPac Basic.

282. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F., *Purification of Laboratory Chemicals*. 3rd Ed. 1988; p 391 pp.

283. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature* **1970**, 227, (5259), 680.

Síntesis de la bis-vinilsulfona 50.

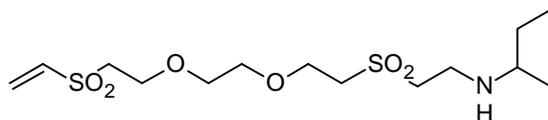
A una disolución de etilenglicol (330 mg, 5.3 mmol) en THF (100 mL) se le añadió DVS (1.6 mL, 16 mmol) y t-BuOK (119 mg, 1.1 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 30 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:1 → 3:1) obteniéndose **50** como un sirope (805 mg, 51%).



IR (film, cm^{-1}): 1608, 1472, 1382, 1310, 1121; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400MHz): δ 6.76 (dd, 2H, $J=16.6$ y 9.8 Hz, HC=), 6.41 (d, 2H, $J=16.6$ Hz, = CH_2 trans), 6.10 (d, 2H, $J=9.8$ Hz, = CH_2 cis), 3.90 (t, 4H, $J=5.8$ Hz, CH_2O), 3.63 (s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.25 (t, 4H, $J=5.6$ Hz, CH_2SO_2); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 137.9, 129.1, 70.3, 64.7, 55.0. **EM-AR:** (FAB+): calc. para: $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$: 321.0442; enc.:321.0442.

Procedimiento general para las síntesis de los compuestos 51 y 52.

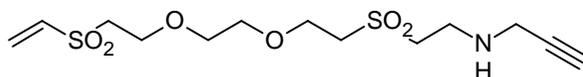
A una disolución de **50** (1.0 g, 3.3 mmol) en Cl_2CH_2 -isopropanol 2:1 se le añadió sec-butilamina o propargilamina (2.2 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 6 horas en el caso de la sec-butilamina y 1 día para la propargilamina. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt → AcOEt-MeOH 10:1).



Se obtuvo **51** como un sirope (472 mg, 57%).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 6.71 (dd, 1H, $J=16.6$ y 10 Hz, HC=), 6.34 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, = CH_2 trans), 6.06 (d, 1H, $J=10$ Hz, = CH_2 cis), 3.84 (m, 4H), 3.58 (s, 4H), 3.29 (t, 2H, $J=5.3$ Hz), 3.21 (m, 4H), 3.06 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), 2.00 (bs, 1H), 1.42 (m, 1H), 1.27 (m, 1H), 0.98 (d, 3H, $J=6.3$ Hz), 0.83 (t, 3H, $J=7.4$ Hz); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 137.9, 129.1, 70.4, 70.3, 64.8, 64.6, 55.3, 54.9, 54.6, 54.4, 40.3, 29.4, 19.6, 10.1.

Capítulo 2

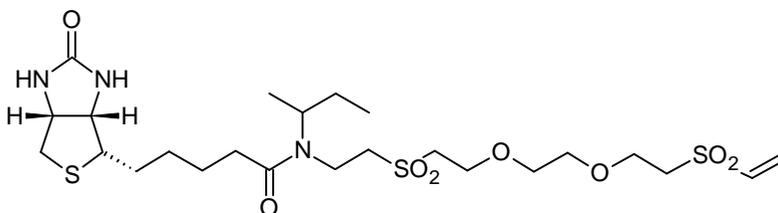


Se obtuvo **52** como un sirope (411 mg, 52%).

IR (film, cm^{-1}): 3588, 3264, 1633, 1470, 1281, 1116; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400MHz): δ 6.76 (dd, 1H, $J=16.6$ y 10 Hz, $\text{HC}=\text{C}$), 6.42 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, $=\text{CH}_2\text{trans}$), 6.12 (d, 1H, $J=10$ Hz, $=\text{CH}_2\text{cis}$), 3.91 (t, 2H, $J=5.5$ Hz), 3.89 (t, 2H, $J=5.7$ Hz), 3.64 (s, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.45 (d, 2H, $J=2.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 3.35 (t, 2H, $J=5.4$ Hz), 3.29 (m, 4H), 3.20 (m, 2H), 2.26 (t, 1H, $J=2.3$ Hz, $\text{HC}\equiv$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 137.9, 129.2, 81.5, 72.1, 70.4, 70.3, 64.9, 64.6, 54.9, 54.7, 54.6, 41.9, 37.8.; **EM-AR**: (FAB+): calc. para: $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}_2\text{Na}$: 376.0864; enc.: 376.0861.

Síntesis del compuesto 56.

Una disolución de biotina (120 mg, 0.49 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido se disolvió en THF anhidro (15 mL) y se le adicionaron **51** (150 mg, 0.40 mmol) y Et_3N (114 μL , 0.80 mmol) disueltos en THF anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 10:1 \rightarrow 5:1) obteniéndose **56** como un sirope (152 mg, 63%).

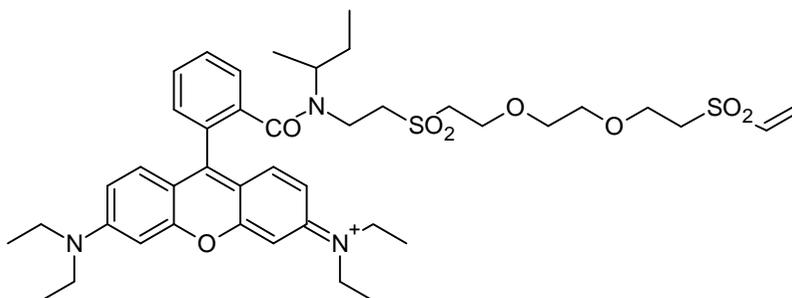


$^1\text{H-RMN}$ (MeOD , 400MHz) mezcla de diastereómeros: δ 6.93 (m, 1H, $\text{HC}=\text{C}$), 6.34 (m, 1H, $=\text{CH}_2\text{trans}$), 6.18 (m, 1H, $=\text{CH}_2\text{cis}$), 4.50 (m, 1H), 4.33 (m, 1H), 3.91 (m, 4H), 3.66 (m, 4H), 3.52 (m, 2H), 3.42-3.24 (m, 8H), 2.94 (m, 1H), 2.72 (d, 1H, $J=12.7$ Hz), 2.46

(m, 2H), 1.76-1.46 (varios m, 8H), 1.26 (m, 3H), 0.90 (m, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (MeOD, 75MHz): δ 178.5, 168.8, 142.3, 132.5, 74.2, 74.1, 68.5, 68.4, 66.1, 64.4, 59.7, 59.1, 58.5, 57.4, 57.1, 43.8, 38.2, 37.0, 32.6, 32.5, 31.5, 29.1, 22.4, 22.3, 14.3.

Síntesis del compuesto 57.

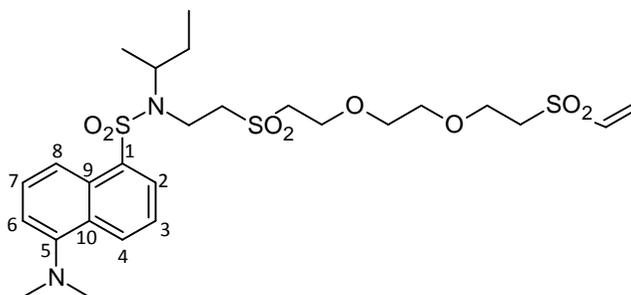
Una disolución de rodamina B (100 mg, 0.21 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 1 noche. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido se disolvió en THF anhidro (15 mL) y se le adicionaron **51** (64 mg, 0.17 mmol) y Et_3N (50 μL , 0.35 mmol) disueltos en THF anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 -MeOH 30:1 \rightarrow 10:1) obteniéndose **57** como un sólido (60mg, 44%).



P.f.: sólido amorfo; **IR** (film, cm^{-1}): 1640, 1589, 1466, 1413, 1339, 1275, 1180, 1128; $^1\text{H-RMN}$ (Cl_3CD , 300MHz): δ 7.73-7.61 (varios m, 4H), 7.41-7.21 (varios m, 3H), 7.07 (m, 1H), 6.94-6.75 (varios m, 3H), 6.36 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, = CH_2 trans), 6.11 (d, 1H, $J=9.9$ Hz, = CH_2 cis), 3.87-3.61 (varios m, 17H), 3.28 (m, 2H), 3.16 (m, 2H), 2.16 (sa, 4H), 1.43-1.26 (varios m, 14H), 0.89-0.71 (varios m, 6H); $^{13}\text{C-RMN}$ (Cl_3CD , 75MHz): δ 169.6, 157.8, 157.6, 155.7, 155.0, 137.9, 136.1, 132.6, 130.5, 130.4, 130.1, 129.9, 129.5, 129.1, 128.2, 114.6, 113.7, 113.5, 96.6, 96.5, 96.4, 70.4, 70.2, 64.5, 64.2, 56.7, 54.8, 53.7, 52.5, 46.4, 46.3, 34.6, 29.7, 28.3, 18.4, 13.7, 12.7, 11.2. ; **EM-AR:** (MALDI-TOF): calc. para $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$: 796.366; enc.: b796.366.

Síntesis del compuesto 58.

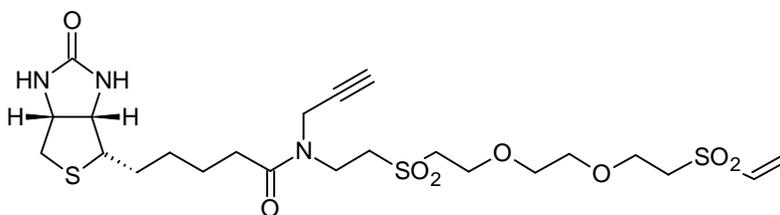
A una disolución de cloruro de dansilo comercial (130 mg, 0.48 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se le añadió **51** (150 mg, 0.40 mmol) y Et₃N (115μL, 0.80mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 2.5 días. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1 → 3:1) obteniéndose **58** como un sirope (182 mg, 74%).



¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8.55 (d,1H, J=8.6 Hz, H-2dan), 8.28 (d, 1H, J=8.6 Hz, H-8dan), 8.24 (d, 1H, J=7.4 Hz, H-4dan), 7.53 (m, 2H, H-3,7dan), 7.17 (d, 1H, J=7.6 Hz, H-6dan), 6.73 (dd, 1H, J=16.6 y 10 Hz, HC=), 6.37 (d, 1H, J=16.6 Hz, =CH₂trans), 6.05 (d, 1H, J=10 Hz, =CH₂cis), 3.91 (m, 4H), 3.80-3.46 (varios m, 9H), 3.27 (t, 2H, J=5.9 Hz), 3.22 (m, 2H), 2.87 (s, 6H), 1.38 (m, 2H), 0.98 (d, 3H, J=6.6 Hz), 0.65 (t, 3H, J=7.3 Hz); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75MHz): δ 138.0, 134.9, 130.9, 130.7, 130.3, 130.2, 129.1, 128.5, 123.4, 119.5, 115.5, 70.8, 70.4, 64.9, 64.8, 56.0, 55.9, 55.0, 54.5, 45.6x2, 35.7, 28.4, 18.8, 11.3.

Síntesis del compuesto 59.

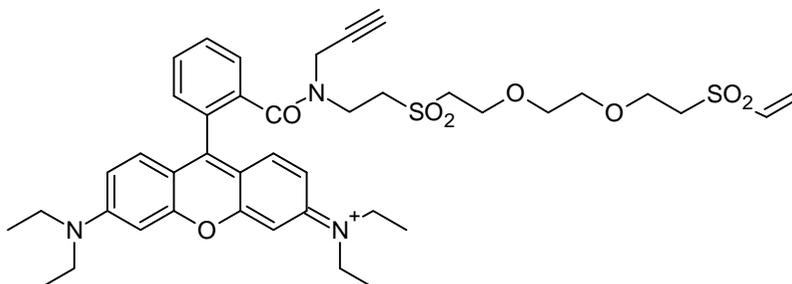
Una disolución de biotina (200 mg, 0.82 mmol) en Cl₂SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 1 h. El exceso de Cl₂SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x5 mL). El crudo obtenido se disolvió en THF anhidro (15 mL) y se le adicionaron **52** (353 mg, 1 mmol) y Et₃N (0.230 μL, 1.6 mmol) disueltos en THF anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose **59** como un sirope (438 mg, 92%).



$[\alpha]_D +18.3$ (c 1, DMSO); **IR** (film, cm^{-1}): 3368, 3261, 2923, 2870, 2115, 1696, 1644, 1461, 1288, 1120, 1034; **$^1\text{H-RMN}$** (MeOD, 400MHz): δ 6.91(dd, 1H, $J=16.1$ y 10.5 Hz, HC=), 6.33 (d, 1H, $J=16.4$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{trans}$), 6.18 (d, 1H, $J=9.8$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{cis}$), 4.49 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 4.27 (sa, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.88 (m, 4H), 3.66 (m, 4H), 3.5 (m, 1H), 3.49-3.20 (varios m, 8H), 2.93 (dd, 1H, $J=12.9$ y 5 Hz), 2.85 (sa, 1H), 2.70 (d, 1H, $J=12.6$ Hz), 2.50 (m, 3H), 1.76-1.46 (varios m, 6H). **$^{13}\text{C-RMN}$** (MeOD, 75MHz): δ 175.6, 166.1, 139.4, 129.6, 79.7, 74.7, 71.4, 71.3, 65.8, 65.6, 63.3, 61.6, 56.9, 55.6, 54.8, 53.3, 41.3, 41.1, 39.1, 33.8, 29.7, 29.5, 25.9.

Síntesis del compuesto 60.

Una disolución de rodamina B (195 mg, 0.41 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante una noche. El exceso Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido se disolvió en THF anhidro (15 mL) y se le adicionaron **52** (174 mg, 0.49 mmol) y Et_3N (116 μL , 0.81 mmol) disueltos en THF anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna ($\text{Cl}_2\text{CH}_2\text{-MeOH}$ 20:1) obteniéndose **60** como un sólido (272 mg, 86%).

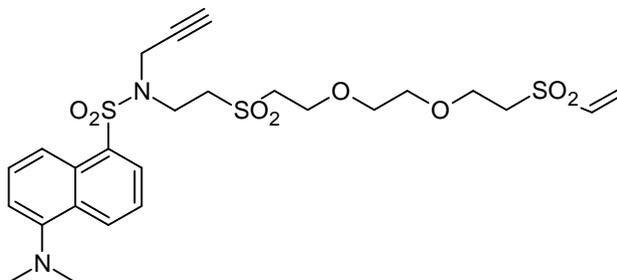


Capítulo 2

P.f.: sólido amorfo; **IR** (film, cm^{-1}): 2170, 1640, 1588, 1463, 1412, 1339, 1273, 1181, 1130, 1073; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300MHz): δ 7.82-7.72 (varios m, 3H), 7.40 (m, 1H), 7.23 (d, 2H, $J=9.6$ Hz), 7.06 (dd, 2H, $J=9.6$ y 2 Hz), 6.81-6.79 (varios m, 3H), 6.36 (d, 1H, $J=16.7$ Hz, $=\text{CH}_2\text{trans}$), 6.11 (1H, d, $J=9.8$ Hz, $=\text{CH}_2\text{cis}$), 3.88-3.62 (m, 18 H), 3.32-3.16 (m, 4H), 2.44(sa, 1H), 1.92 (sa, 4H), 1.42 (t, 12H, $J=7.3\text{Hz}$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 168.3, 157.8, 155.7, 137.9, 134.9, 131.7, 131.1, 130.5, 130.3, 129.1, 127.8, 114.7, 113.8, 96.5, 74.5, 70.3, 64.6, 64.5, 54.9, 53.7, 51.7, 46.3, 40.4, 39.1, 29.8 12.8.; **EM-AR:** (MALDI-TOF) cal.para $\text{C}_{41}\text{H}_{52}\text{O}_8\text{N}_3\text{S}_2$: 778.319; enc.:778.336

Síntesis del compuesto 61.

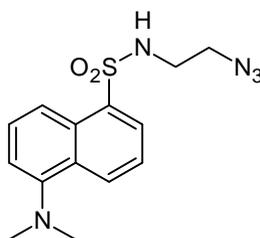
A una disolución de cloruro de dansilo comercial (165 mg, 0.61 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se le añadió **52** (180 mg, 0.51 mmol) y Et_3N (150 μL , 1.02mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 2.5 días. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1 \rightarrow 3:1) obteniéndose **61** como un sirope (257 mg, 86%).



IR (film, cm^{-1}): 3262, 1568, 1453, 1388, 1310, 1124; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400MHz): δ 8.57 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-2dan), 8.28 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, H-8dan), 8.20 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, H-4dan), 7.55 (m, 2H, H-3,7dan), 7.19 (d, 1H, $J=7.4$ Hz, H-6dan), 6.75 (dd, 1H, $J=16.6$ y 10 Hz, HC=), 6.38 (d, 1H, $J=16.6\text{Hz}$, $=\text{CH}_2\text{trans}$), 6.08 (d, 1H, $J=9.8$ Hz, $=\text{CH}_2\text{cis}$), 4.22 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 3.89 (m, 4H), 3.83 (m, 2H), 3.64 (s, 4H), 3.55 (m, 2H), 3.26 (t, 2H, $J=5.8$ Hz), 3.21 (t, 2H, $J=5.2$ Hz), 2.88 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.16 (s, 1H, HC \equiv); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 152.0, 137.9, 133.6, 131.2, 130.2, 130.1, 130.0, 129.1, 128.5, 123.2, 119.2, 115.5, 77.0, 74.5, 70.5, 70.2, 64.8, 64.6, 54.8, 54.2, 53.5, 45.4, 40.8, 37.2.

Síntesis de los azido derivados 63, 64 y 67.**Síntesis del azido-derivado 63²⁷⁶.**

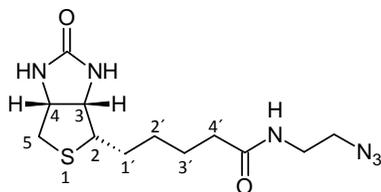
A una disolución de cloruro de dansilo comercial (600 mg, 2.2 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (15 mL) se le añadió 2-azidoetilamina (390 mg, 4.5 mmol) y Et_3N (500 μL , 3.5 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1) obteniéndose **63** como un sirope (680 mg, 96%).



IR (film, cm^{-1}): 3294, 2100, 1569, 1452, 1405, 1317, 1139, 1092; **¹H-RMN** (CDCl_3 , 300MHz): δ 8.55 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-2dan), 8.29 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-8dan), 8.25 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, H-4dan), 7.56 (t, 1H, $J=7.8$ Hz) y 7.51 (t, 1H, $J=8.1$ Hz)[H-3, 7dan], 7.18 (d, 1H, $J=7.6$ Hz, H-6dan), 5.36 (sa, 1H, NH), 3.27 (t, 2H, $J=5.8$ Hz, CH_2N_3), 3.05 (c, 2H, $J=5.9$ Hz, CH_2NH), 2.89 (s, 6H, 2x CH_3); **¹³C-RMN** (CDCl_3 , 75MHz): δ 152.1, 134.6, 130.8, 130.0, 129.5, 128.7, 123.2, 118.6, 115.4, 50.9 (CH_2N_3), 45.5 (2x CH_3), 42.4 (CH_2N).

Síntesis del azido-derivado 64²⁷⁷.

Una disolución de biotina (300 mg, 1.22 mmol) en Cl_2SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido se disolvió en acetonitrilo anhidro (15 mL) y se le adicionaron 2-azidoetilamina (212 mg, 2.45 mmol) y Et_3N (525 μL , 3.68 mmol) disueltos en acetonitrilo anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose **64** como un sólido (279 mg, 73%).

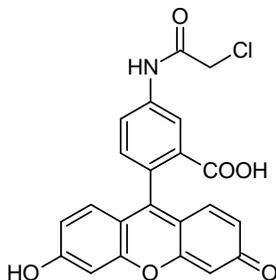


$^1\text{H-RMN}$ (MeOD- d_4 , 400MHz): δ 4.48 (dd, 1H, $J=7.8$ y 4.9 Hz) y 4.30 (dd, 1H, $J=7.8$ y 4.5 Hz) [H-3,4], 3.40-3.34 (m, 4H), 2.92 (dd, 1H, $J=12.7$ y 5.0 Hz), 2.70(d, 1H, $J=12.7$ Hz), 2.21 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, CH_2CO), 1.70-1.30 (varios m, 6H, 2H-1', 2H-2', 2H-3');

$^{13}\text{C-RMN}$ (MeOD- d_4 , 100 MHz): δ 62.2, 60.5, 55.8, 50.4, 39.9, 38.8, 35.5, 28.6, 28.3, 25.6.

Síntesis del cloro-derivado 66²⁸⁴

A una disolución de fluoresceinamina (450 mg, 1.3 mmol) en MeOH se le adicionó anhídrido cloroacético (443 mg, 2.6 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 día. El precipitado que fue apareciendo se filtró, lavó (con MeOH y posteriormente éter) y secó obteniéndose así **66** como un sólido (440 mg, 80%).

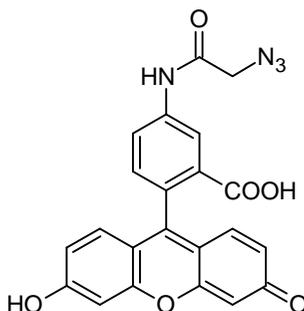


P.f.: $>380^\circ\text{C}$ desc.; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3239, 3055, 1667, 1538, 1238, 1169, 1110, 910; $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.75 (s, 1H, NH), 10.09 (s, 2H, 2xOH), 8.26 (s, 1H), 7.80 (d, 1H, $J=8.3$ Hz), 7.21 (d, 1H, $J=8.3$ Hz), 6.63 (d, 2H, $J=1.5$ Hz), 6.56 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 6.51 (dd, 2H, $J=8.7$ y 1.7 Hz), 4.30 (s, 2H, CH_2Cl); $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , 100MHz): δ 168.5, 165.3, 159.5, 151.9, 147.4, 140.1, 129.1, 127.0, 126.6, 124.7, 113.8, 112.6, 109.6, 102.2, 83.1, 43.5 (CH_2Cl); **EM-AR:** (FAB+): calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{NO}_6\text{NaCl}$: 446.0407; enc.: 446.0400.

284. Aita, K.; Temma, T.; Kuge, Y.; Saji, H., Development of a novel neodymium compound for in vivo fluorescence imaging. *Luminescence* **2007**, 22, 455-461.

Síntesis del azido-derivado 67.

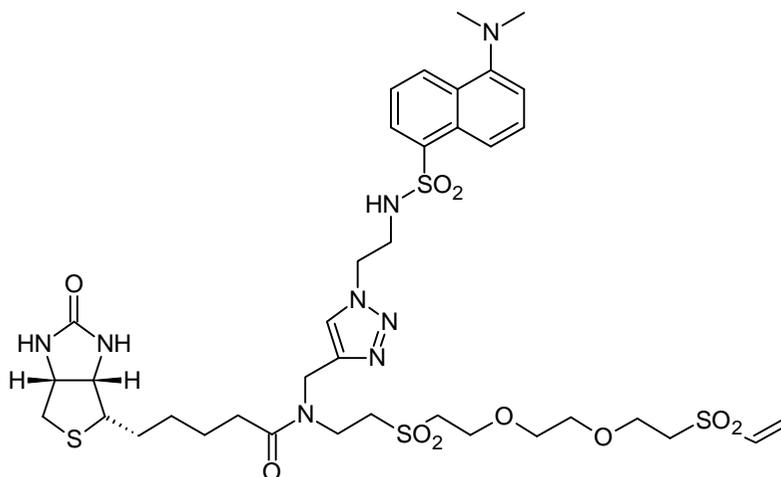
A una suspensión de **66** (400 mg, 0.94 mmol) en MeOH (20 mL) se le adicionó azida sódica (306 mg, 4.7 mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500 W, 65°C, 10h). El disolvente se eliminó por evaporación a vacío y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt, AcOEt-MeOH 1:1 a MeOH) obteniéndose **67** como un sólido (330 mg, 82%).



P.f.: >270°C desc.; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3388, 2119, 2036, 1680, 1628, 1588, 1465, 1397, 1330, 1270, 1169, 1109; **$^1\text{H-RMN}$** (MeOD- d_4 , 300MHz): δ 8.12 (d, 1H, $J=2.1$ Hz), 8.00 (dd, 1H, $J=8.2$ y 2.2 Hz), 7.22 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.16 (d, 2H, $J=9.3$ Hz), 6.62 (dd, 1H, $J=8.2$ y 2.2 Hz), 6.60 (s, 3H), 4.08 (s, 2H, CH_2N_3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (MeOD- d_4 , 100MHz): δ 179.6, 168.7, 159.7, 140.2, 132.5, 131.2, 122.9, 121.9, 121.8, 114.5, 104.2, 53.3 (CH_2N_3); **EM-AR:** (FAB+): calc. para: $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6\text{Na}$: 453.0811; enc.: 453.0819.

Procedimiento general para la síntesis de los agentes de etiquetado doble 68, 69 y 70.

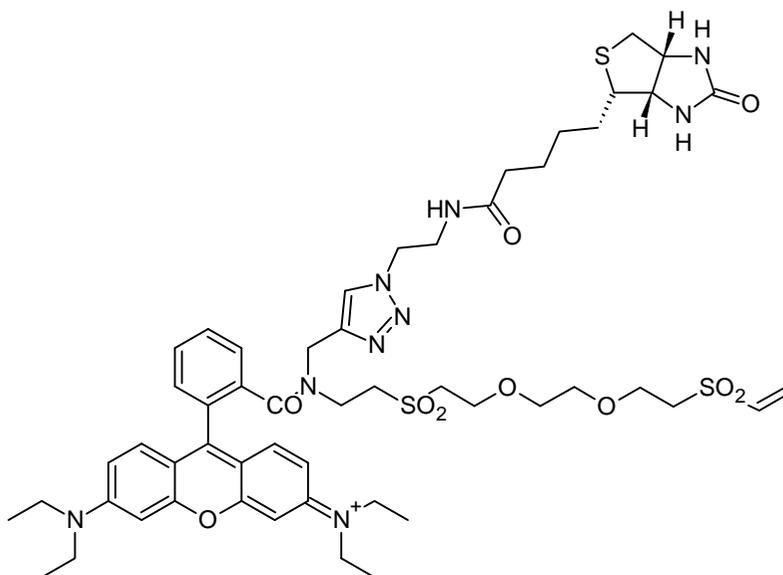
A una disolución del propargil derivado **59** o **60** (0.2 mmol) en MeOH (15mL) se le añadió el correspondiente azido derivado **63** y **64** o **67** (0.24mmol) respectivamente, Et_3N (85 μL , 0.6 mmol) y $(\text{Et}_3\text{O})\text{P}\cdot\text{CuI}$ (10 mg, 0.03 mmol) como catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 3.5 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna.

Síntesis del compuesto 69.

Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 3:1) se obtuvo **69** como un sólido (162 mg, 90%).

P.f.: >260 °C des.; $[\alpha]_D^{25}$ (c 1, DMF); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3398, 1689, 1635, 1457, 1310, 1136,; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 600MHz): δ 8.43 (d,1H, $J=8.5$ Hz, H-2dan), 8.18 (sa, 1H, NH), 8.11 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-8dan), 8.01 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, H-4dan), 7.86 (s, 1H, H-triazol), 7.59-7.53 (varios m, 2H, H-3,7dan), 7.22 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 6.85 y 6.84 (2dd, 1H, $J=16.5$ y 9.8 Hz, HC=), 6.38 (sa, 1H, NH), 6.33 (s, 1H, NH), 6.17 (d, 1H, $J=16.6$ Hz, =CH₂trans), 6.14 (d, 1H, $J=9.9$ Hz, =CH₂cis) 4.48 y 4.42 (2s, 2H, CH₂NCO), 4.3-4.31 (m, 2H, CH₂N-triazol), 4.28 (m, 1H, CHbiotina), 4.11 (m,1H, CHbiotina), 3.73 (m, 2H), 3.69 (m, 3H), 3.61 (m, 1H), 3.48 (m, 4H), 3.44 (m, 1H), 3.33-3.29 (varios m, 5H), 3.24-3.19 (varios m, 2H, CH₂SO₂), 3.07 (m,1H), 2.79 (s, 6H, 2xCH₃), 2.77 (m, 1H, SCHbiotina), 2.55 (d, 1H, $J=12.5$ Hz), 2.40-2.34 (varios m, 2H), 1.59-1.25 (varios m, 6H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 75MHz): δ 172.3, 162.6, 151.2, 143.0, 137.9, 135.4, 129.5, 128.9, 128.8, 128.5, 128.1, 127.8, 123.4, 118.8, 115.1, 69.3, 69.2, 66.2, 63.8x2, 60.9, 59.0, 55.3, 53.4, 52.6, 51.1, 49.2, 44.9x2, 42.2, 39.7, 38.9, 32.1, 28.1x2, 24.5.

Síntesis del compuesto 70.



Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 3:1 → MeOH) se obtuvo **70** como un sólido (157 mg, 72%).

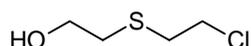
P.f.: sólido amorfo; **IR** (film, cm^{-1}): 1640, 1588, 1466, 1413, 1275, 1180, 1128;

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , 500MHz): δ 8.09(s, 1H, H-triazol), 7.90 (m, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.17-7.08 (varios m, 3H), 6.99-6.89 (varios m, 3H), 6.85 (dd, 1H, $J=16.6$ y 9.9 Hz, HC=), 6.35 (sa, 2H, 2xNH), 6.13 (d, 1H, $J=16.3$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{trans}$), 6.11 (d, 1H, $J=9.8$ Hz, $\text{H}_2\text{C}=\text{cis}$), 4.51 (sa, 2H) 4.37 (t, 2H, $J=5.8$ Hz) 4.26 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.77-3.28 (varios m, 21H), 3.17 (m, 1H), 3.03 (m, 4H), 2.77 (dd, 1H, $J=12.4$ y 5 Hz), 2.66 (m, 1H), 2.54 (d, 1H, $J=12.4$ Hz), 2.02 (m, 2H), 1.56-1.38 (varios m, 4H), 1.20 (varios m, 14 H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 125MHz): δ 177.7, 173.3, 167.8, 162.3, 162.1, 160.6, 160.3, 147.1, 143.2, 140.3, 136.8, 135.8, 135.1, 135.0, 133.8, 132.7, 132.6, 119.5, 118.2, 109.9, 101.1, 74.6, 74.5, 71.5, 69.0, 68.9, 66.2, 64.2, 60.5, 58.7, 57.4, 55.3, 54.2, 50.5, 50.4, 45.0, 43.9, 40.2, 33.3, 33.2, 30.3, 17.7, 13.7;

EM-AR: (MALDI-TOF) calc. para $\text{C}_{53}\text{H}_{72}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_3\text{Na}$: 1090.456; enc.: 1090.458.

Síntesis del compuesto 73²⁷⁹

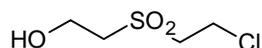
Una disolución de mercaptoetanol (300 mg, 3.84 mmol) en acetonitrilo anhidro (15 mL) se desoxigenó por burbujeo de Ar durante 5 min. Se añadió bromocloroetano (0.7 mL, 7.68 mmol) y Cs₂CO₃ (1.9 g, 5.76 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a t.a durante 16 horas. Tras filtración del Cs₂CO₃, el disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1) obteniéndose **73** como sirope (410 mg, 76%).



IR (film, cm⁻¹): 3350, 1421, 1274, 1213, 1063, 1047, 1011; **¹H-RMN** (CDCl₃, 300MHz): δ 3.77 (t, 2H, *J*=6 Hz, CH₂OH), 3.66 (t, 2H, *J*=7.7 Hz, CH₂Cl), 2.90 (t, 2H, *J*=7.7 Hz, SCH₂CH₂Cl), 2.78 (t, 2H, *J*=6 Hz, SCH₂CH₂OH), 2.65 (sa, 1H, OH); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75MHz): δ 60.8 (CH₂OH), 43.10 (CH₂Cl), 35.3 y 34.0 (2xSCH₂). **EM-AR**: (FAB+) calc. para C₄H₉SOCl: 140.0063; enc.: 140.0055.

Síntesis del compuesto 74²⁸⁰

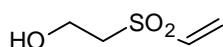
A una disolución de **73** (237 mg, 1.68 mmol) en AcOH (8.5 mL) se le añadió H₂O₂ del 33% (3.4 mL). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 día. Tras evaporación a vacío el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna (éter) obteniéndose **74** como sirope (183 mg, 63%).



IR (film, cm⁻¹): 3506, 1719, 1631, 1394, 1318, 1286, 1119, 1065; **¹H-RMN** (MeOD, 300MHz): δ 4.81 (sa, 1H, OH), 3.98 (t, 2H, *J*=5.5 Hz, CH₂OH), 3.93 (t, 2H, *J*=7.1 Hz, CH₂Cl), 3.64 (t, 2H, *J*=7.1 Hz, SCH₂CH₂Cl), 3.32 (t, 2H, *J*=5.5 Hz, SCH₂CH₂OH); **¹³C-RMN** (MeOD, 75MHz): δ 57.6, 57.4, 56.6, 36.7.

Síntesis del compuesto 75²⁸⁰.

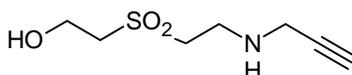
A una disolución de **74** (846 mg, 4.9 mmol) en THF (10 mL) se le añadió Et₃N (2.1 mL, 15 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1.5 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose **75** como sirope (540 mg, 81%).



IR (film, cm⁻¹): 3501, 1386, 1292, 1121, 1062; **¹H-RMN** (MeOD, 300MHz): δ 6.88 (dd, 1H, *J*=16.6 y 10 Hz, HC=), 6.33 (d, 1H, *J*=16.6 Hz, =CH₂trans), 6.17 (d, 1H, *J*=10 Hz, =CH₂trans), 4.76 (s, 1H, OH), 3.92 (t, 2H, *J*=5.9 Hz, CH₂OH), 3.26 (t, 2H, *J*=5.9 Hz, CH₂SO₂); **¹³C-RMN** (MeOD, 75MHz): δ 139.0 (SO₂CH=CH₂), 129,8 (SO₂CH=CH₂), 57.8, 56.7.

Síntesis del compuesto 76.

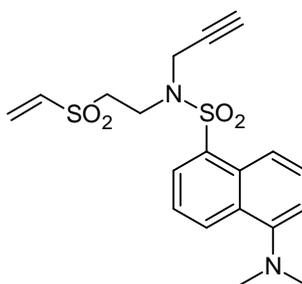
A una disolución de **75** (577 mg, 4.24 mmol) en THF-isopropanol 1:2 (20 mL) se le añadió propargilamina (212 mg, 3.85 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose **76** como un sólido (710 mg, 96%).



P.f.: 79-81°C; **IR** (KBr, cm⁻¹): 3309, 3262, 3145, 1474, 1360, 1287, 1256, 1119, 1080, 1023.; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 500MHz): δ 5.08 (sa, 1H), 3.76 (t, 2H, CH₂O), 3.31 (d, 2H, *J*=2.4 Hz, CH₂C≡), 3.23 (m, 4H, 2xCH₂SO₂), 3.07 (t, 1H, *J*=2.4Hz, C≡CH), 2.94(t, 2H, *J*=6.8Hz, CH₂N), 2.23 (sa, 1H). **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75MHz): δ 80.9 (C≡CH), 72.5 (C≡CH), 56.7, 56.2, 54.6, 41.7, 37.9.

Síntesis del compuesto 77.

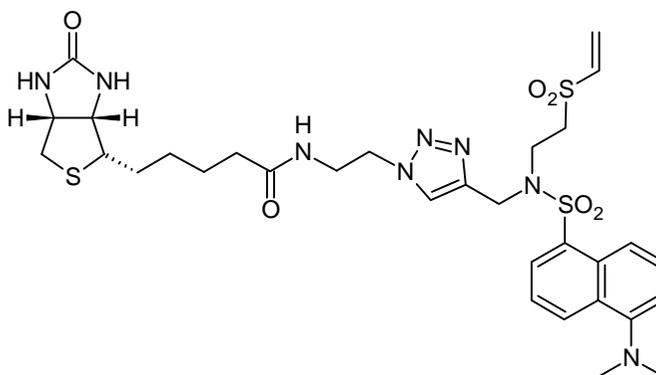
A una disolución de **76** (160 mg, 0.84 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) se le añadió cloruro de dansilo comercial (680 mg, 2.52 mmol) y Et₃N (0.71 mL, 5.02 mmol). La mezcla de reacción mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 1 día. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:3) obteniéndose **77** como un sirope (230 mg, 68%).



IR (film, cm⁻¹): 3273, 1568, 1454, 1387, 1309, 1135, 1069; **¹H-RMN** (CDCl₃, 300MHz): δ 8.62 (d, 1H, *J*=8,5 Hz, H-2dan), 8.28 (d, 1H, *J*=8.7Hz, H-8dan), 8.24 (d, 1H, *J*=7.4 Hz, H-4dan), 7.60(m, 2H, H-3,7dan), 7.24 (d, 1H, *J*=7.6 Hz, H-6dan), 6.65 (dd, 1H, *J*=16.5 y 9.7 Hz, HC=), 6.45 (d, 1H, *J*=16.5Hz, =CH₂trans), 6.21 (d, 1H, *J*=9.7 Hz, =CH₂cis), 4.23 (d, 2H, *J*=2.3Hz, CH₂C≡), 3.77 (m, 2H, CH₂SO₂), 3.42 (m, 2H, CH₂N), 2.92 (s, 6H, 2xCH₃), 2.22 (t, 1H, *J*=2.3 Hz, HC≡); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75MHz): δ 151.9, 135.9, 133.3, 131.2, 131.1, 130.1, 130.0, 128.5, 123.1, 119.0, 115.4, 76.8, 74.5, 52.5, 45.4, 41.0, 37.4. **EM-AR:** (FAB+): calc. para C₁₉H₂₂N₂O₄S₂Na: 429.0919; enc.: 429.0914.

Síntesis del compuesto 78.

A una disolución de **77** (128 mg, 0.31 mmol) en MeOH (15 mL) se le adicionaron el compuesto **64** (89 mg, 0.29 mmol), Et₃N (122μL, 0.87 mmol) y CuI(C₂H₅O)₃P (10 mg, 0.029 mmol) como catalizador. La mezcla de reacción mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 4:1) obteniéndose **78** como un sólido (188 mg, 92%).



IR (KBr, cm⁻¹): 3390, 3297, 1694, 1569, 1456, 1311, 1139, 1074, 794, 620, 569 cm⁻¹;
¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz): δ 8.55 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, H-2dan), 8.21 (d, 1H, *J*=8.5 Hz, H-8dan), 8.15 (d, 1H, *J*=7.2 Hz, H-4dan), 7.64 (s, 1H, H-triazol), 7.54 (m, 2H, H-3, 7dan), 7.17 (d, 1H, *J*=7.4 Hz, H-6dan), 7.03 (sa, 1H), 6.58 (m, 2H), 6.28 (d, 1H, *J*=16.4 Hz, =CH₂trans), 6.09 (d, 1H, *J*=9.8 Hz, =CH₂cis), 5.86 (sa, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 4.30 (sa, 1H), 3.63 (m, 4H), 3.26 (m, 2H) 3.10 (sa, 1H), 2.87 (s, 6H, 2xCH₃), 2.69 (d, 1H, *J*=12.5 Hz), 2.13 (sa, 2H), 1.80-1.30 (varios m, 6H); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75MHz):: δ 174.1, 164.3, 152.0, 142.7, 135.8, 133.7, 131.2, 130.1, 129.9, 129.8, 128.7, 124.6, 123.3, 118.8, 115.5, 61.7, 60.2, 55.8, 53.9, 52.3, 49.8, 45.4, 43.1, 41.3, 40.7, 39.4, 35.7, 29.7, 28.2, 28.1, 25.5.

Etiquetado de BSA, avidina y ConA con los agentes de etiquetado simple 56, 58 y 57.

De los reactivos de marcaje se prepararon disoluciones con una concentración de 15 mg/mL en una mezcla de DMSO:H₂O al 50%. En la **tabla 2.6.** se recogen las cantidades, tanto de proteína como de agente de etiquetado, que se utilizaron para llevar a cabo el marcaje, así como la concentración final de proteína en tampón HEPES 50 mM pH 8. La estequiometría se da en moles de proteína (monómero) por moles de reactivo de marcaje.

proteína/ compuesto	concentración proteína	nmoles proteína	nmoles marcaje	estequiometría
BSA-56	8 mg/mL	74.4	369	1:5
			735.4	1:10
Avidina-58	3.3 mg/mL	139.8	577.8	1:4
			1154.2	1:8
ConA-57	6.5 mg/mL	195.3	990	1:5
			1980	1:10

Tabla 2.6. Concentración de proteína y estequiometría utilizada en el marcaje.

Las disoluciones se incubaron a 37°C durante 1 día y a las 3, 8 y 24 horas se tomaron alícuotas de 50µL que se combinaron con un volumen igual de tampón de carga de electroforesis para finalizar la reacción. Transcurridas las 24 horas de reacción las muestras se dializan a temperatura ambiente frente a tampón HEPES 10 mM pH 8, el cual contenía una pequeña cantidad de etanolamina. A lo largo de 4 días se realizan hasta 7 cambios de tampón. En el caso de la ConA el tampón de diálisis contenía además 1mM de iones Ca²⁺ y Mn²⁺, pero a pesar de ello la mayor parte de la muestra precipitó. Finalizada la diálisis las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5min y se recogieron los sobrenadantes.

Etiquetado de HRP y PA con el agente de etiquetado doble 68.

Se preparó una disolución de enzima, tanto de HRP como de PA, de 2 mg/mL en tampón HEPES 100 mM pH 8.5 y una disolución de **68** de 25 mM en DMSO y se trabajó con las cantidades que aparecen en la **tabla 2.7.**

Clave	μL peroxidasa	μL de 68	estequiometría
HRP10-PA10	300	5.5	1:10
HRP20-PA20	300	11	1:20
HRP30-PA30	300	16.5	1:30
HRP40-PA40	300	22	1:40
HRP50-PA50	300	27.5	1:50

Tabla 2.7. Volúmenes de proteína y agente de etiquetado y estequiometría de reacción.

Las disoluciones se incubaron durante una noche a 22°C y a 37°C.

Etiquetado de HRP con los agentes de etiquetado doble 68, 70, 69 y 78.

Se preparó una disolución de HRP de 2 mg/mL en tampón HEPES 100 mM pH 8.5 y una disolución de los diferentes reactivos de marcaje de 25 mM en DMSO y se trabajó con las cantidades que aparecen en la **tabla 2.8**.

Clave	mL HRP	μL de reactivo	estequiometría
HRP-25-68	1.5	69	1:25
HRP-25-70	1.5	69	1:25
HRP-50-68	1.5	138	1:50
HRP-50-70	1.5	138	1:50
HRP-50-69	1.5	138	1:50
HRP-50-78	1.5	138	1:50

Tabla 2.8. Volúmenes de proteína y agente de etiquetado y estequiometría de reacción.

Las disoluciones resultantes se incubaron durante 1 día y 37°C para **68** y **70** y durante 3 días a 37°C para **69** y **78**. Transcurrido ese tiempo las muestras se dializaron a t.a. frente a tampón PBS 50 mM pH 7.5 NaCl 100 mM. A lo largo de 5 días se realizan hasta 8 cambios de tampón. En la diálisis se incluyó también una muestra de peroxidasa sin marcar.

Tinción de proteínas previo a electroforesis.**Experiencia 1.**

Se incubó a 100°C la disolución resultante de la **tabla 2.9.** y a los 10, 20 y 30 minutos de reacción se extrajeron 50 μL y la reacción se paró añadiendo 50 μL de tampón de carga.

	μL
BSA 0.728 mg/mL	200
HEPES 0.5M pH 8.8	200
57 15mg/mL (DMSO:agua)	2

Tabla 2.9. Cantidades empleadas para llevar a cabo la tinción de BSA.

Para llevar a cabo la electroforesis se cargaron 4 μL de la disolución final.

Experiencia 2.

Se incubó a 100°C la disolución resultante de la **tabla 2.10.** y a los 2, 5 y 10 minutos de reacción se extrajeron 50 μL y la reacción se paró añadiendo 25 μL de tampón de carga.

	μL
BSA 1 mg/mL	33
HEPES 0.5M pH 8.8	53
57 1.5mg/mL (DMSO:agua)	2
agua	134

Tabla 2.10. Cantidades empleadas para llevar a cabo la tinción de BSA.

Experiencia 3.

Se incubaron a 100°C durante 10 minutos las disoluciones resultantes de la **tabla 2.11.**, transcurridos los cuales se tomaron 50 μL y se les adicionaron 100 μL de tampón de carga, lo que da lugar a una concentración de proteína de 50 ng/ μL .

	μL
BSA o lisozima (1 mg/mL)	33
HEPES 0.5M pH 8.8	53
57 o 58 1.5mg/mL (DMSO:agua)	2
agua	134

Tabla 2.11. Cantidades empleadas para llevar a cabo la tinción de BSA o lisozima.

Para la electroforesis se cargan 5 y 10 μL (250 y 125 ng respectivamente).

Experiencia 3.

Se incubaron a 100°C durante 10 minutos las disoluciones resultantes de la **tabla 2.12.**, transcurridos los cuales se les adicionaron 30 μL de tampón de carga.

	μL
Extracto (2.6 mg/mL)	20
HEPES 0.5M pH 8.8	3
57 o 58 1.5mg/mL (DMSO:agua)	2, 4, 6
agua	5,3, 1

Tabla 2.12. Cantidades empleadas para llevar a cabo la tinción del extracto vegetal.

Además, se marcó un estándar de pesos moleculares, pero en este caso se adicionaron 2 μL de una disolución de 15 mg/mL de **57** o **58** ya que en el medio tenemos Tris y β-mercaptoetanol que pueden reaccionar con la vinilsulfona consumiendo parte del reactivo.

Estudio de selectividad.

Para el estudio de selectividad se emplearon las cantidades que aparecen en la **tabla 2.13**.

	muestra bloqueada	muestra sin bloquear
BSA 5 mg/mL	66	66
Tampón fosfato 0.5M pH 8.7	25	25
Bromoetanol	5	-
57 1.5 mg/mL	4	4

Tabla 2.13. Vólmenes expresados en μL empleados en el ensayo.

Se prepararon dos disoluciones de BSA en tampón fosfato pH 8.7 y a una de ellas se le adicionaron 5 μL de bromoetanol para bloquear los grupos tiol. Ambas disoluciones se incubaron a temperatura ambiente durante una noche y a continuación se les adicionaron 4 μL de una disolución de **57** de 1.5 mg/mL en DMSO. Tras 5, 15 y 30 minutos de reacción se tomaron alícuotas de 25 μL y se bloquearon con 10 μL de β -mercaptoetanol. Tras una hora se añadieron 25 μL de tampón de carga y de esta disolución final se cargaron 8 μL en los geles.

Ensayos ELISA.

1.- Se prepara una disolución de avidina de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6 100mM. Se adicionan 200 μL de esta disolución a cada uno de los pocillos excepto a A1 y a H12 y se incuban durante toda la noche a 4°C.

2.- Se llevan a cabo dos lavados con PBST (380 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) durante 3 minutos cada uno y otros dos lavados con PBS en las mismas condiciones.

3.- Se bloquean los pocillos con una disolución de BSA del 0,1% en PBS durante 1 hora a 37°C (380 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$) y la placa se vuelve a lavar exactamente igual que en el paso 2.

4.- Se depositan sobre distintos pocillos 200 μL de una solución de la proteína marcada o sin marcar que se pretende ensayar en tampón fosfato 50mM pH 7.5 y 100mM de NaCl. La placa se incubaba a 37°C durante 1 hora y transcurrido ese tiempo se lava como en los casos anteriores.

Capítulo 2

5.- Se adicionan 200 μ L/pocillo de disolución de revelado y se incuba a 37°C durante 20 minutos. Para parar la reacción se adicionan 50 μ L de una disolución de H₂SO₄ 1.25M.

Tampón PBS: tampón fosfato 10mM pH 7.4 NaCl 120Mm.

Tampón PBST: tampón PBS con un 0.05% de Tween 20.

Disolución reveladora: 50mL de tampón citrato 150mM pH 5 con 20 mg de orto-fenilendiamina y 100 μ L de H₂O₂ (10 Vol.).

Medida de la actividad de peroxidasa (HRP)

Se llevan a cabo diluciones seriadas de la disolución madre de HRP etiquetada, cuya concentración se ha determinado mediante Bradford, hasta alcanzar una concentración de ~0.015 mg/mL. De esta disolución se toman 10 μ L y se adicionan a 1mL de disolución reveladora (la misma que se ha utilizado para los ensayos ELISA). El color que se va generando se mide espectrofotométricamente a 492nm en modo cinético. La pendiente de la recta que obtenemos nos proporciona la actividad de la proteína y la actividad específica se obtiene dividiendo este valor entre los mg de proteína.

CAPÍTULO 3
SÍNTESIS DE SISTEMAS FLUORESCENTES
MEDIANTE REACCIONES CuAAC. APLICACIONES.

Capítulo 3.

SÍNTESIS DE SISTEMAS FLUORESCENTES MEDIANTE REACCIONES CuAAC. APLICACIONES.

3.1. Lectinas.

Inicialmente las **lectinas** fueron identificadas como aglutininas por S Weir Mitchell en veneno de serpiente (*Crotolus durissus* 1860) y por H. Stillmark en extractos de semillas de *Ricinus communis* (1888)²⁸⁵⁻²⁸⁷. Fue necesario medio siglo para que empezaran a aparecer las primeras evidencias de la interacción de estas proteínas con carbohidratos²⁸⁸. A finales de los años 40 William C. Boyd y Rose M. Reguera²⁸⁹ observaron que ciertas semillas contenían aglutininas específicas para antígenos de los grupos sanguíneos humanos. Esta capacidad de las aglutininas de las plantas para distinguir los eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos llevó a Boyd a darles el nombre de lectinas, del latín *legere*, que significa elegir. Este término fue generalizado por N. Sharon y H. Lis para designar a un grupo más amplio de proteínas²⁹⁰.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que no poseen actividad enzimática y pero que reconocen de manera específica y reversible carbohidratos de la superficie celular o en suspensión. Se trata de un grupo heterogéneo de proteínas de diferente tamaño y estructura, presentes en la mayoría de los seres vivos (plantas, animales y organismos inferiores, como bacterias y virus) muchas de las cuales se caracterizan por su capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados. De hecho, el método clásico utilizado

-
- 285.** Mitchell, S. W., Researches upon the venom of the rattlesnake. *Contrib. Knowl.* **1860**, XII, 89-90.
286. Mitchell, S. W.; Reichert, E. T., Researches upon the venom of poisonous serpents. *Contrib. Knowl.* **1886**, XXVI, 155.
287. Stillmark, H., Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus Comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. *Dorpat* **1888**.
288. Sumner, J. B.; Howell, S. F., The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology* **1936**, 32, (2), 227-237.
289. Boyd, W. C.; Reguera, R. M., hemagglutinating substances for human cells in various plants. *Journal of Immunology* **1949**, 62, (3), 333-339.
290. Sharon, N.; Lis, H., Lectins - cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **1972**, 177, (4053), 949.

para la detección y caracterización de lectinas, se basa en su capacidad para aglutinar y precipitar eritrocitos, hemoaglutinación que puede ser inhibida por la adición de azúcares específicos de esa lectina.

3.1.1. Clasificación de las lectinas.

En base a su **especificidad** las lectinas pueden ser clasificadas en cinco grandes grupos en función del monosacárido hacia el que presentan una mayor afinidad: manosa, galactosa/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido N-acetilneuramínico (**figura 3.1.**). Solamente hay casos excepcionales en los que una lectina presenta afinidad por otro azúcar diferente a los que acabamos de citar. Generalmente la afinidad de las lectinas por monosacáridos es débil, con constantes de asociación en el rango de milimolar y a pesar de ser selectivas, en algunas ocasiones toleran variaciones en la posición C-2 del anillo de piranosa. Así, numerosas lectinas que reconocen galactosa presentan también afinidad por la N-acetilgalactosamina y las que reconocen manosa suelen presentar afinidad por glucosa.

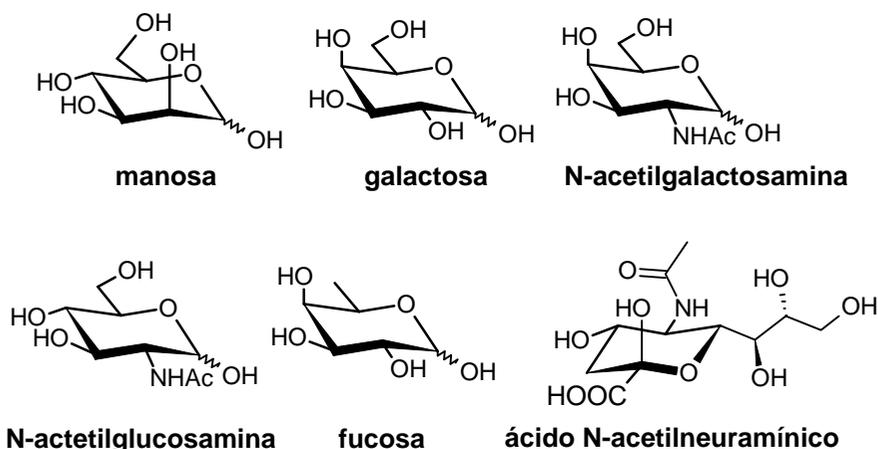


Figura 3.1. Estructura de los monosacáridos en los que se basa la clasificación de lectinas en función de su especificidad.

Algunas lectinas pertenecientes al mismo grupo presentan una afinidad mayor, o casi exclusiva, hacia el glicósido α o β del correspondiente monosacárido, mientras que otras carecen de esta especificidad anomérica.

Sin embargo, la clasificación de las lectinas atendiendo a su especificidad hacia un monosacárido no recoge lo anteriormente descrito, y además puede enmascarar el hecho de que en general las lectinas presentan una mayor afinidad por oligosacáridos (que en realidad son sus ligandos naturales) y que ciertas lectinas sólo interaccionan con éstos. Por ello, en ocasiones, las lectinas son clasificadas en tres grandes grupos según su **estructura molecular**:

Lectinas simples: Son lectinas constituidas por un pequeño número de subunidades, no necesariamente idénticas, de peso molecular inferior a 40kDa. Cada subunidad presenta un lugar de reconocimiento de carbohidrato, y en algunas ocasiones otro dominio adicional. En este grupo se encuentran prácticamente todas las lectinas vegetales y las galectinas, que son una familia de lectinas animales que reconocen galactosa.

Lectinas tipo mosaico o multidominio: Son moléculas con pesos moleculares que varían dentro de un amplio rango y que están formadas por varios dominios, sólo uno de los cuales presenta capacidad de unión a carbohidratos. En este grupo nos encontramos con proteínas de origen muy diverso, desde proteínas víricas a lectinas animales de tipo C, P e I.

Lectinas de tipo ensamblado molecular: Se trata de filamentos helicoidales compuestos por subunidades proteicas de diverso tipo y dispuestas en un orden bien definido. Generalmente sólo una de estas subunidades presenta un dominio de complejación de carbohidratos, el resto cumple funciones estructurales. Estas lectinas son comunes en bacterias.

SIMPLES	<ul style="list-style-type: none"> - Legumbres - Cereales - Otras lectinas vegetales - Galectinas
MOSAICO	<ul style="list-style-type: none"> - Hemaglutininas virales - Lectinas animales Tipo C - Lectinas animales Tipo I
ENSAMBLADO MOLECULAR	<ul style="list-style-type: none"> - Lectinas bacterianas

Tabla 3.1. Clasificación de los principales tipos de lectina según su estructura.

3.1.2. Funciones y aplicaciones de las lectinas.

Aunque las lectinas de plantas fueron las primeras en ser descubiertas y son las mejor estudiadas su **función** todavía no está clara, a diferencia de lo que ocurre en el caso de las lectinas de animales, bacterias y virus. Los virus y bacterias emplean procesos de interacción proteína-carbohidrato para fijarse a las células que van a invadir^{291,292}. Las lectinas animales desempeñan una gran variedad de funciones, como por ejemplo, defensa frente a patógenos, tráfico celular, regulación inmune o adhesión celular. Algunas de estas funciones se recogen en la **tabla 3.2**.

LECTINA	FUNCIÓN
Galectinas	Regulación del crecimiento celular y apoptosis, modulación de la adhesión celular
Colectinas E- y P-selectinas	Respuesta inmune innata Transporte de leucocitos hacia las zonas donde se produce inflamación
Calnexina, calreticulina, ERGIC-53	Control en la biosíntesis de glicoproteínas
Dectina-1 Siglecs	Respuesta inmune innata Interacciones célula-célula en el sistema inmune y nervioso
Espermadhesina Receptor de manosa en macrófagos	Interacción espermatozoide-óvulo Respuesta inmune innata

Tabla 3.2. Funciones de algunas lectinas.

Actualmente se proponen dos teorías sobre la función de las lectinas en plantas. Una de ellas, la más general, afirma que las lectinas vegetales se encargan de proteger a las plantas frente a hongos, insectos y animales predadores. Una segunda hipótesis afirma que las lectinas actúan como mediadores de simbiosis

291. Karlsson, K. A., Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **1995**, 5, (5), 622-635.

292. Aronson, M.; Medalia, O.; Schori, L.; Mirelman, D.; Sharon, N.; Ofek, I., Prevention of colonization of the urinary-tract of mice with escherichia-coli by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-d-mannopyranoside. *Journal of Infectious Diseases* **1979**, 139, (3), 329-332.

entre plantas leguminosas y microorganismos fijadores de nitrógeno²⁹³. Aunque se están empezando a descubrir nuevos procesos en los que estas lectinas se encuentran implicadas²⁹⁴, lo que obliga a la revisión de las dos hipótesis anteriores.

Todos los procesos biológicos en los que intervienen las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido, por lo que las lectinas de legumbres constituyen un sistema modelo para estudiar este tipo de procesos de reconocimiento ya que pueden obtenerse puras en gran cantidad y presentan diversas especificidades a carbohidratos. Las lectinas aisladas de diversas fuentes vegetales han demostrado ser herramientas útiles para otras **aplicaciones**^{290,295-297}:

- ✓ Tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos.
- ✓ Las lectinas inmovilizadas en un soporte inerte han sido y son utilizadas en cromatografía de afinidad para purificar macromoléculas que contienen carbohidratos: glicoproteínas, enzimas, hormonas y diversos receptores de membrana, como el receptor de la insulina²⁹⁸
- ✓ Aislamiento, purificación y estudios estructurales de polímeros conteniendo carbohidratos.
- ✓ La actividad mitogénica de algunas lectinas ha sido muy importante para el análisis de los procesos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos *in vivo* y son aplicadas en la valoración de la actividad celular de diferentes enfermedades infecciosas.
- ✓ Estudios histoquímicos y citoquímicos.
- ✓ Se han utilizado en la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas.

293. Sharon, N.; Lis, H., History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **2004**, *14*, (11), 53R-62R.

294. Van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Rouge, P.; Peumans, W. J., Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science* **2004**, *9*, (10), 484-489.

295. Lis, H.; Sharon, N., Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry* **1986**, *55*, 35-67.

296. Hernández-Díaz, P.; Martín-González, O.; Rodríguez de Pablos-Vélez, Y.; Ganem-Báez, F. A., Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* **1999**, *15*, (2), 91-95.

297. Hernandez-Cruz, P.; Pérez-Campos, E.; Martínez-Martínez, L.; Ortiz, B.; Martínez, G., Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB* **2005**, *24*, (1), 21-27.

298. Hedo, J. A.; Harrison, L. C.; Roth, J., Binding of insulin-receptors to lectins - evidence for common carbohydrate determinants on several membrane-receptors. *Biochemistry* **1981**, *20*, (12), 3385-3393.

3.1.3. Características estructurales.

En las lectinas, el sitio de unión a carbohidratos se encuentra situado en la superficie de la proteína formando depresiones poco profundas, a diferencia de algunos receptores o enzimas en los que los azúcares son envueltos completamente en profundas depresiones²⁹⁹. En general el sitio de unión a la lectina dentro de una misma familia es bastante similar, sin embargo entre distintas familias las diferencias son apreciables, incluso cuando la especificidad es la misma.

La unión lectina-carbohidrato³⁰⁰⁻³⁰² tiene lugar a través de una red de puentes de hidrogeno, entre los grupos hidroxilo de los azúcares y los grupos NH, hidroxilo y átomos de O de la proteína, e interacciones hidrofóbicas (interacciones de Van der Waals), entre aminoácidos aromáticos y zonas hidrofóbicas del carbohidrato. Especial importancia tienen los puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua^{303,304} por su papel en el proceso de reconocimiento, así como la presencia de ciertos metales, como el Ca²⁺ o Mn²⁺, que son fundamentales para que produzca este tipo de unión.

3.1.4. Lectinas de legumbres.

Las lectinas de legumbres se encuentran principalmente en las semillas de este tipo de plantas. Aunque comparten una elevada homología en su estructura primaria y la terciaria está muy conservada existe un amplio abanico de estructuras cuaternarias y de diferentes especificidades³⁰⁵ frente a carbohidratos.

299. Quioco, F. A., Protein-carbohydrate interactions - basic molecular-features. *Pure and Applied Chemistry* **1989**, 61, (7), 1293-1306.

300. Rini, J. M., Lectin structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1995**, 24, 551-577.

301. Weis, W. I.; Drickamer, K., Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry* **1996**, 65, 441-473.

302. Sharon, N.; Lis, H., Carbohydrate-protein interactions. *Chemistry in Britain* **1990**, 26, (7), 679-682.

303. Loris, R.; Stas, P. P. G.; Wyns, L., Conserved waters in legume lectin crystal-structures - the importance of bound water for the sequence-structure relationship within the legume lectin family. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, (43), 26722-26733.

304. Lemieux, R. U., How water provides the impetus for molecular recognition in aqueous solution. *Accounts of Chemical Research* **1996**, 29, (8), 373-380.

305. Prabu, M. M.; Sankaranarayanan, R.; Puri, K. D.; Sharma, V.; Surolia, A.; Vijayan, M.; Suguna, K., Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin: X-ray analysis of the lectin at 2.5 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* **1998**, 276, (4), 787-796.

Las lectinas de legumbres son proteínas constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas de 25-30kDa, cada una de las cuales presenta un único sitio de unión de carbohidratos con la misma especificidad. Es decir, son dímeros o tetrámeros, aunque en realidad los tetrámeros son dímeros de dímeros. Además del sitio de unión a carbohidratos algunas lectinas de legumbres poseen una **zona hidrofóbica**³⁰⁶ que une compuestos no polares como la adenina o el ácido indolacético.

Necesitan Ca^{2+} y algún metal de transición, preferentemente Mn^{2+} , para su unión a carbohidratos³⁰⁷. Estos **cationes** se encuentran muy próximos uno del otro (4.5 Å) y se sitúan en una zona cercana (9-13 Å) al sitio de unión. No participan activamente en las interacciones con el azúcar pero estabilizan la proteína en una conformación adecuada para el reconocimiento de carbohidratos. El primer catión que se une a la lectina es el Mn^{2+} lo que provoca un reordenamiento en los aminoácidos de la zona formándose el lugar donde se une el Ca^{2+} . La posterior unión del Ca^{2+} termina de estabilizar la proteína en la configuración activa para el reconocimiento del azúcar³⁰⁸. El sitio de unión de estas lectinas está constituido, principalmente, por residuos pertenecientes a cuatro zonas flexibles (*loops A, B, C y D*) que intervienen en la interacción con el azúcar^{309,310}. La especificidad de estas lectinas, al menos frente a monosacáridos y disacáridos, se ha explicado en función a variaciones en longitud y composición de alguna de estas zonas flexibles^{305,311}.

306. van Driessche, E., Structure and function of Leguminosae lectins. *Adv. Lectin Res.* **1988**, *1*, 73-134.

307. Emmerich, C.; Helliwell, J. R.; Redshaw, M.; Naismith, J. H.; Harrop, S. J.; Raftery, J.; Kalb, A. J.; Yariv, J.; Dauter, Z.; Wilson, K. S., High-resolution structures of single-metal-substituted Concanavalin-A - the co,ca-protein at 1.6-angstrom and the ni,ca-protein at 2.0-angstrom. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **1994**, *50*, 749-756.

308. Loris, R.; Hamelryck, T.; Bouckaert, J.; Wyns, L., Legume lectin structure. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1383*, (1), 9-36.

309. Sharma, V.; Surolia, A., Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: Size of the combining site loops and their primary specificity. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267*, (2), 433-445.

310. Young, N. M.; Oomen, R. P., Analysis of sequence variation among legume lectins - a ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *Journal of Molecular Biology* **1992**, *228*, (3), 924-934.

311. Derewenda, Z.; Yariv, J.; Helliwell, J. R.; Kalb, A. J.; Dodson, E. J.; Papiz, M. Z.; Wan, T.; Campbell, J., The structure of the saccharide-binding site of Concanavalin-A. *Embo Journal* **1989**, *8*, (8), 2189-2193.

Otras lectinas que precisan de la presencia de Ca^{2+} son las lectinas animales de tipo C³¹². En estas lectinas, al contrario que en las lectinas de legumbres, el Ca^{2+} actúa activamente en la unión del carbohidrato.

3.1.4.1. Concanavalina A (ConA).

La **concanavalina A (ConA)** pertenece a la familia de lectinas de legumbres y se encuentra en la semilla de la habichuela de la clase Jack (*Canavalia ensiformis*). Fue aislada por primera vez por James B. Sumner en 1919 (de hecho fue la primera lectina en ser cristalizada) quien en 1936²⁸⁸ puso de manifiesto que interaccionaba específicamente con manosa y glucosa. Además, fue la primera lectina en ser secuenciada y su estructura tridimensional ha sido resuelta mediante difracción de rayos X tanto libre como unida a diversos ligandos^{311,313-316}.

La concanavalina A se encuentra como dímero a pH menor de 6.0, como tetrámero a pH mayor de 7.0 y en equilibrio entre dímero y tetrámero a valores intermedios de pH. Además del pH la concentración de NaCl también juega un papel importante. Así, cuando la concentración de sal es alta tiende a estar en forma de tetrámero³¹⁷. Cada subunidad tiene un peso molecular de 27kDa y presenta una estructura elipsoidal con dimensiones 42x40x39Å²⁹⁰.

312. Drickamer, K., 2 distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, (20), 9557-9560.

313. Bouckaert, J.; Hamelryck, T. W.; Wyns, L.; Loris, R., The crystal structures of Man(alpha 1-3)Man(alpha 1-0)Me and Man(alpha 1-6)Man(alpha 1-0)Me in complex with Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, (41), 29188-29195.

314. Hardman, K. D.; Ainsworth, C. F., Structure of Concanavalin-A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **1972**, 11, (26), 4910-4919.

315. Becker, J. W.; Reeke, G. N.; Wang, J. L.; Cunningham, B. A.; Edelman, G. M., Covalent and 3-dimensional structure of Concanavalin-A. 3. Structure of monomer and its interactions with metals and saccharides. *Journal of Biological Chemistry* **1975**, 250, (4), 1513-1524.

316. Naismith, J. H.; Field, R. A., Structural basis of trimannoside recognition by Concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, (2), 972-976.

317. Dam, T. K.; Brewer, C. F., Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chemical Reviews* **2002**, 102, (2), 387-429.

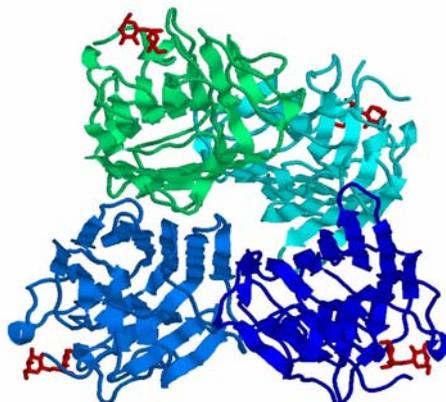


Figura 3.2. Estructura de la Concanavalina A tetramérica.

La ConA es específica de los **anómeros α** de manosa y glucosa. Presenta una elevada afinidad por el trisacárido $\text{Man}\alpha(1,3)[\text{man}\alpha(1,6)]\text{man}$ que se encuentra presente en los glicanos de todas las N-glicoproteínas^{318,319}. Los carbohidratos con sustituyentes aromáticos en la posición C-1 presentan una mayor afinidad por la ConA que los azúcares que no los tienen, lo que pone de manifiesto la presencia de una región hidrofóbica cercana al sitio de unión^{320, 321}. Aunque no es algo habitual, se ha observado que la ConA es capaz de interactuar con péptidos que contienen el motivo Tyr-Pro-Try con una afinidad similar a la del metil α -D-manopiranosido^{322,323}. Esta afinidad no se ha observado en otras lectinas

318. Baenziger, J. U.; Fiete, D., Structural determinants of Concanavalin-A specificity for oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, 254, (7), 2400-2407.

319. Debray, H.; Decout, D.; Strecker, G.; Spik, G.; Montreuil, J., Specificity of 12 lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to n-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry* **1981**, 117, (1), 41-55.

320. Poretz, R. D.; Goldstein, I. J., Hydrophobic character of phenyl glycosides and its relation to binding of saccharides to Concanavalin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, 125, (3), 1034.

321. Poretz, R. D.; Goldstein, I. J., Protein-carbohydrate interaction - mode of binding of aromatic moieties to Concanavalin-A, phytohemagglutinin of jack bean. *Biochemical Pharmacology* **1971**, 20, (10), 2727.

322. Oldenburg, K. R.; Loganathan, D.; Goldstein, I. J.; Schultz, P. G.; Gallop, M. A., Peptide ligands for a sugar-binding protein isolated from a random peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (12), 5393-5397.

323. Scott, J. K.; Loganathan, D.; Easley, R. B.; Gong, X. F.; Goldstein, I. J., A family of concanavalin a-binding peptides from a hexapeptide epitope library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (12), 5398-5402.

de leguminosas específicas de Glc/Man. Debido a su abundancia y a su fácil obtención es una de las lectinas más estudiadas y empleada en biología.

3.2. Proteínas de unión.

En el espacio periplasmático de las bacterias se encuentran presentes un gran conjunto de proteínas (*proteínas periplamáticas*) que pueden clasificarse en base a su función. Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las denominadas **proteínas de unión** ("*binding proteins*"). Éstas presentan una elevada afinidad por un sustrato o ligando específico (generalmente en el rango de 0.1 a $1\mu\text{M}^{324}$) y se encuentran en el periplasma en elevadas concentraciones (del orden de $1\mu\text{M}$ en algunos casos). El sustrato o ligando de las proteínas de unión puede ser de muy diversa naturaleza, amino ácidos, iones, péptidos, azúcares y proteínas (**tabla 3.3.**). Se trata de proteínas monoméricas con pesos moleculares comprendidos entre los 23 y 54kDa, la mayoría de ellas en torno a 33kDa.

TIPO DE SUSTRATO	SUSTRATO	NOMBRE
AZÚCARES	arabinosa	ABP, AraF
	maltosa, maltodextrinas	MBP , MaIE
	galactosa, glucosa	GGBP, MgIB
	ribosa	RBP, RbsB
	xilosa	XBP, XylF
PÉPTIDOS	dipéptidos	DppA
	tripéptidos	OBP, OppA
	oligopéptidos	TppBP
AMINOÁCIDOS	lisina, arginina	ArgT
	cisteína	CysBP
	glutamato, aspartato	Glu-AspBP
IONES	tiosulfato	CysP
	níquel	NikA
	citrato	TctC

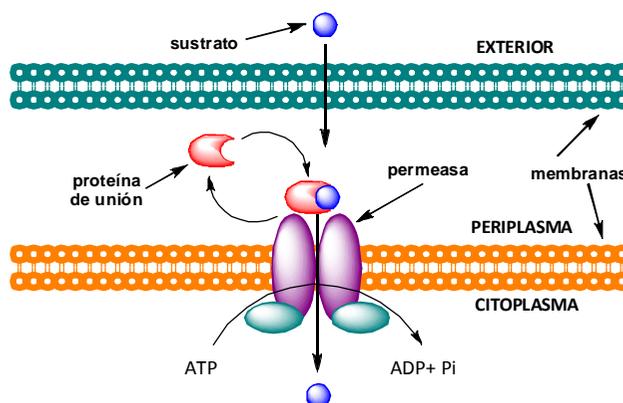
Tabla 3.3. Algunas proteínas de unión y especificidad de las mismas.

324. Miller, D. M.; Olson, J. S.; Pflugrath, J. W.; Quioco, F. A., Rates of ligand-binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* **1983**, 258, (22), 3665-3672.

3.2.1. Funciones de las proteínas de unión.

Las proteínas de unión, al no encontrarse localizadas en la membrana celular, no son proteínas transportadoras, sin embargo, desempeñan una función esencial junto a una proteína transportadora en el **transporte** de ciertos sustratos hacia el interior de la célula. Estas intervienen en lo que se conoce como *transporte activo* (transporte de sustancias en contra de un gradiente de concentración, lo que requiere un gasto energético). Existen distintos tipos de transporte activo y el que se encuentra relacionado con las proteínas periplásmicas de unión es el *transporte activo sensible al choque osmótico*. Este tipo de transporte es propio de bacterias Gram-negativas y la energía requerida la suministra el ATP.

En este transporte el sustrato exógeno normalmente entra al periplasma a través de algún canal inespecífico o porina de membrana externa y pasa al periplasma donde se une a la correspondiente proteína de unión periplásmica con gran afinidad, y le induce un cambio conformacional, pasando de una configuración denominada **“abierta”** a otra que recibe el nombre de **“cerrada”** y en la cual el sustrato se encuentra “enterrado” entre dos lóbulos de la proteína. A continuación la proteína de unión interacciona con una permeasa (que es un heterodímero formado por dos proteínas integrales de membrana) y el heterodímero de membrana cambia de conformación, abre su canal para el sustrato y este pasa al citoplasma. Finalmente, la hidrólisis de ATP catalizada por las proteínas periféricas ABC (asociadas a las proteínas integrales por su lado citoplásmico) suministra la energía para que el heterodímero de membrana vuelva a su estado inicial, preparado así para otro ciclo de transporte.



Capítulo 3

Figura 3.3. Transporte activo mediado por una proteína de unión.

Mediante este sistema de transporte muchas bacterias Gram-negativas logran introducir numerosos tipos de sustancias: azúcares (arabinosa, galactosa, maltosa, ribosa, xilosa, etc.), aminoácidos (histidina, glicina, leucina, etc...), oligopéptidos y algunas vitaminas y metales.

Algunas de estas proteínas de unión también intervienen en lo que se conoce como **quimiotaxis**. Es un sistema de respuesta gobernado químicamente que consiste en el desplazamiento que realizan las células móviles a favor o en contra de un gradiente químico. Aunque todas las proteínas de unión actúan como receptores de alta afinidad en el transporte activo sensible al choque osmótico³²⁵ sólo cuatro (con afinidad por D-ribosa, D-galactosa/D-glucose, maltosa y oligopéptidos) intervienen también en la quimiotaxis³²⁶.

Diferentes estudios cristalográficos y espectroscópicos han puesto de manifiesto que estas proteínas de unión sufren un gran cambio conformacional tras la unión de su sustrato³²⁷⁻³²⁹. Los cambios estructurales que sufren estas proteínas son fundamentales para el reconocimiento de los receptores de membrana. La conformación "**abierta**" parece estar estabilizada a través de interacciones entre los dominios y la "**cerrada**" gracias a las interacciones que se establecen entre el sustrato y la proteína³²⁵.

325. Shilton, B. H.; Flocco, M. M.; Nilsson, M.; Mowbray, S. L., Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: The maltose-, glucose/galactose- and ribose-binding proteins. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 264, (2), 350-363.

326. Manson, M. D., Bacterial motility and chemotaxis. *Advances in Microbial Physiology* **1992**, 33, 277-346.

327. Quijoch, F. A., Atomic structures of periplasmic binding-proteins and the high-affinity active-transport systems in bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **1990**, 326, (1236), 341-352.

328. Ames, G. F. L., Bacterial periplasmic transport-systems - structure, mechanism, and evolution. *Annual Review of Biochemistry* **1986**, 55, 397-425.

329. Zukin, R. S., Evidence for a conformational change in the escherichia-coli maltose receptor by excited-state fluorescence lifetime data. *Biochemistry* **1979**, 18, (11), 2139-2145.

3.2.2. Proteína de unión a maltosa (MBP).

La proteína de unión a maltosa (**MBP**-*maltose binding protein*) pertenece a la familia de proteínas periplásmicas de unión de las bacterias Gram-negativas. Interviene en el transporte³³⁰ de maltodextrinas a través de la membrana citoplásmica y en la quimiotaxia³³¹ hacia estos sustratos.⁷⁸ Es una proteína monomérica con un peso molecular de 40.6kDa y estable en un amplio rango de pH (4-10.5). Presenta una estructura elipsoidal con unas dimensiones de 30x40x65Å y tiene dos dominios globulares separados entre sí por una hendidura de 18Å de profundidad donde se encuentra el sitio de unión del sustrato. Estos dos dominios reciben el nombre de dominio-N y dominio-C y se encuentran unidos entre sí por tres segmentos peptídicos que presentan una gran flexibilidad. El sitio de unión es rico en grupos polares y aromáticos que interaccionan con el sustrato a través de puentes de hidrógeno e interacciones de tipo van der Waals. Además en la interacción con el ligando intervienen puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua.

De las proteínas de unión a azúcares la MBP es la que presenta una **especificidad** más versátil. Puede unir maltodextrinas lineales de dos hasta siete unidades glicosídicas con unión $\alpha(1\rightarrow4)$ y maltodextrinas cíclicas como la α -CD o la β -CD. Por esta razón algunos autores prefieren referirse a ella como proteína de unión a maltodextrina, en lugar de usar su nombre original. Las constantes de unión a las maltodextrinas lineales y cíclicas varían desde 1.6×10^{-7} a $40.0 \times 10^{-7} \text{M}$ ³²⁴ (siendo la maltotriosa el mejor ligando con una constante de unión 20 veces superior a la de la maltosa) y una estequiometría de unión 1:1³³². Esta proteína, aunque reconoce tanto al anómero α como al β , presenta una mayor afinidad por el primero de ellos. Gehring y col.³³³ pusieron de manifiesto mediante RMN que a 10°C la MBP se une a la α -maltosa con una afinidad 3 veces superior que a la β -maltosa, y que en el caso

330. Nikaido, H., Maltose transport-system of escherichia-coli - an ABC-type transporter. *Febs Letters* **1994**, 346, (1), 55-58.

331. Zhang, Y. H.; Conway, C.; Rosato, M.; Suh, Y.; Manson, M. D., Maltose chemotaxis involves residues in the n-terminal and c-terminal domains on the same face of maltose-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, (32), 22813-22820.

332. Kellermann, O. K.; Ferenci, T., Maltose-binding protein from escherichia-coli. *Methods in Enzymology* **1982**, 90, 459-463.

333. Gehring, K.; Williams, P. G.; Pelton, J. G.; Morimoto, H.; Wemmer, D. E., Tritium NMR-spectroscopy of ligand-binding to maltose-binding protein. *Biochemistry* **1991**, 30, (22), 5524-5531.

Capítulo 3

de maltodextrinas de mayor tamaño el cociente K^{α}/K^{β} es incluso mayor (entre 10 y 30).

La β -CD no es un sustrato natural de la MBP, al igual que la α -CD. Ninguna de estas ciclodextrinas es metabolizada por *Echerichia coli* y además no inducen ningún tipo de respuesta quimiotáctica. Sin embargo, se ha demostrado que la β -CD es capaz de unirse a la MBP con una constante de afinidad del mismo orden que la que presentan sus ligandos lineales^{324,334}. La estructura del complejo MBP- β -CD³³⁴ muestra que la proteína permanece en una conformación abierta prácticamente idéntica a la estructura de la proteína libre. La β -CD se sitúa en la hendidura con tres de las unidades glicosídicas unidas al dominio-C, en una posición similar a la que adopta la maltosa. Al superponer ambas estructuras se observa que algunas de las interacciones entre los residuos aromáticos de la proteína y los azúcares se conservan en ambos casos.

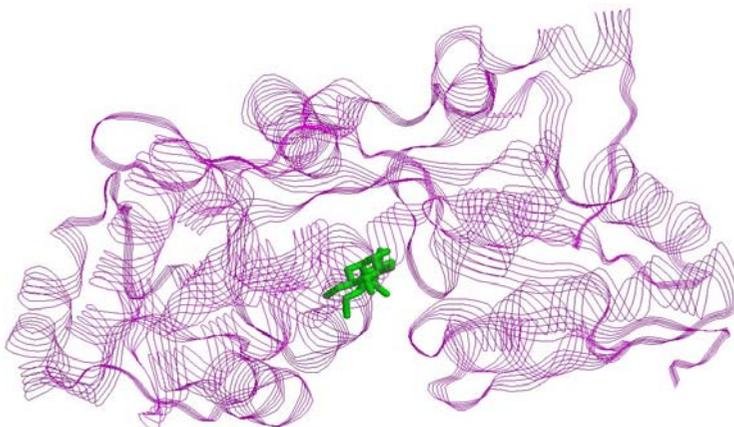


Figura 3.4 Estructura de la MBP.

334. Sharff, A. J.; Rodseth, L. E.; Quioco, F. A., Refined 1.8-angstrom structure reveals the mode of binding of beta-cyclodextrin to the maltodextrin binding-protein. *Biochemistry* **1993**, 32, (40), 10553-10559.

3.3. Anisotropía de fluorescencia.

3.3.1. Principios Generales.

Tras excitar con luz polarizada, la emisión de muchas muestras se encuentra también polarizada. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de anisotropía y las muestras que presentan valores de anisotropía distintos de cero se dice que presentan una emisión polarizada. El origen de este fenómeno se encuentra en la existencia de momentos de transición para la absorción y la emisión situados en direcciones específicas dentro de la estructura del fluoróforo. En soluciones homogéneas el estado fundamental del fluoróforo se encuentra orientado al azar. Cuando este sistema es excitado con luz polarizada aquellos fluoróforos que tienen su momento de transición para la absorción orientado a lo largo de vector eléctrico de la luz que induce se excitan preferentemente (fotoselección). De ahí que la población en el estado excitado no se encuentre orientada al azar, sino que hay un mayor número de moléculas excitadas que tienen su momento de transición orientado a lo largo del vector eléctrico de la luz polarizada de excitación.

Para ilustrar la metodología supongamos que la muestra es excitada con luz polarizada verticalmente. En esta situación el vector eléctrico de la luz de excitación se encuentra orientado paralelo al eje vertical o eje z. A continuación, la intensidad de la emisión se mide a través de un polarizador. Cuando el polarizador de emisión se orienta paralelo a la luz de excitación la intensidad observada recibe el nombre de $I_{||}$. De la misma manera, cuando el polarizador se encuentra orientado perpendicular a la excitación la intensidad de emisión se denota como I_{\perp} .

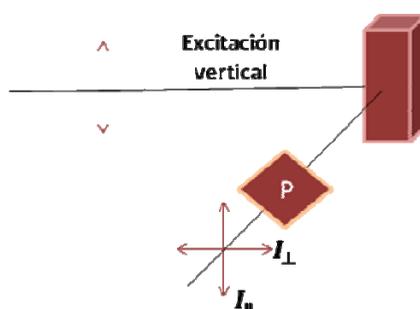


Figura 3.5. Metodología utilizada para medir la anisotropía de una muestra. P: polarizador.

En estas condiciones la **anisotropía**(*r*) se define como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Ecuación 3.1.

La **anisotropía** es una magnitud sin dimensiones e independiente de la intensidad total de la muestra ya que la diferencia ($I_{\parallel}-I_{\perp}$) se normaliza con respecto a la intensidad total del sistema, que es $I_T=I_{\parallel}+2I_{\perp}$. En algunas publicaciones se emplea el término **polarización** (*p*), en lugar de anisotropía, el cual viene dado por:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Ecuación 3.2.

Los valores de anisotropía y polarización se encuentran relacionados a través de las siguientes expresiones:

$$r = \frac{2P}{3 - P} \quad P = \frac{3r}{2 + r}$$

Ecuaciones 3.3.

Generalmente se prefiere usar la anisotropía frente a la polarización porque la mayoría de las expresiones teóricas son considerablemente más simples cuando se trabaja con valores de anisotropía.

Dos son las configuraciones más usadas para llevar a cabo la medida experimental de estos parámetros. La **configuración en L**, en la cual sólo se usa un canal de emisión, y la **configuración en T**, en la cual los componentes paralelos y perpendiculares de la emisión de fluorescencia se miden simultáneamente a través de diferentes canales. La medida en L es el método más utilizado ya que la mayoría de los fluorímetros sólo presentan un canal de emisión. Brevemente, supongamos que la muestra se excita con luz verticalmente polarizada y que la emisión se observa a través de un monocromador. El monocromador normalmente presenta diferentes eficiencias de transmisión para la luz polarizada verticalmente y horizontalmente, ya que estos polarizan parcialmente la luz incidente. Por lo tanto, la rotación del polarizador de emisión cambiará el valor de las intensidades

medidas incluso si la muestra emite luz no polarizada. Esto hace que las intensidades que se miden no sean las intensidades I_{\parallel} y I_{\perp} que estamos buscando y que tengamos que aplicar correcciones.

Sea I_{HV} la señal correspondiente a una excitación horizontalmente polarizada y una emisión verticalmente polarizada y S_V y S_H las sensibilidades del canal de emisión para los componentes polarizados verticalmente y horizontalmente. En estas condiciones las intensidades de emisión polarizadas cuando se excita con luz polarizada verticalmente son:

$$I_{VV} = kS_V I_{\parallel} \quad I_{VH} = kS_H I_{\perp}$$

Ecuaciones 3.4.

Donde k es un factor de proporcionalidad que tiene en cuenta el rendimiento cuántico del fluoróforo y otros factores instrumentales. Dividiendo las dos ecuaciones se llega a:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V I_{\parallel}}{S_H I_{\perp}} = G \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$$

Ecuación 3.5.

De donde se deduce que para poder calcular el verdadero valor del cociente I_{\parallel}/I_{\perp} necesitamos determinar el factor-G, que es el cociente de las sensibilidades del sistema de detección para la luz polarizada verticalmente y horizontalmente.

$$G = \frac{S_V}{S_H}$$

Ecuación 3.6.

El factor-G depende de la longitud de onda de emisión y del paso de banda del monocromador. En ocasiones, las medidas de anisotropía se llevan a cabo utilizando filtros de emisión en lugar de monocromadores. Los filtros generalmente no presentan ningún efecto sobre la polarización y por lo tanto para ellos se espera un $G=1.0$. Sin embargo este factor se debe determinar siempre.

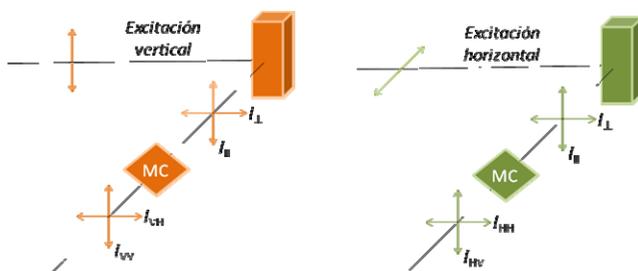


Figura 3.6. Metodología utilizada para establecer el factor-G.

El factor-G se puede medir experimentalmente utilizando una excitación polarizada horizontalmente. En esta situación los componentes de la intensidad de emisión polarizados verticalmente y horizontalmente son iguales y proporcionales a I_{\perp} . Ésto es debido a que las dos orientaciones son perpendiculares a la polarización de la excitación. Por lo tanto, cualquier diferencia entre I_{HV} y I_{HH} es debida a las propiedades del sistema de detección. Así:

$$\frac{I_{HV}}{I_{HH}} = \frac{S_V I_{\perp}}{S_H I_{\perp}} = \frac{S_V}{S_H} = G$$

Ecuación 3.7.

Cuando conocemos el factor-G el cociente I_{\parallel}/I_{\perp} se puede calcular utilizando la expresión:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{1}{G} = \frac{I_{VV} I_{HH}}{I_{VH} I_{HV}} = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}$$

Ecuación 3.8.

Y la anisotropía viene dada por:

$$r = \frac{\left(\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}\right) - 1}{\left(\frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}\right) + 2}$$

Ecuación 3.9.

3.3.2. Causas de despolarización.

La **despolarización** de la emisión puede ser consecuencia de diversos fenómenos. Existe una causa intrínseca de despolarización debida al desplazamiento angular entre los momentos de absorción y emisión. Pero existen también factores extrínsecos al fluoróforo que tienen lugar durante el tiempo de vida del estado excitado del mismo. Estos son la difusión rotacional del fluoróforo y la transferencia de energía resonante (RET) entre los fluoróforos.

La **difusión rotacional** del fluoróforo es una de las causas principales de despolarización. Las medidas de anisotropía muestran el desplazamiento angular que sufre el fluoróforo entre la absorción y la emisión de un fotón, el cual depende de la velocidad de la difusión rotacional durante el tiempo de vida del estado excitado. Estos movimientos de difusión dependen a su vez de la viscosidad del disolvente y del tamaño y la forma de la molécula (fluoróforo).

RET sólo tiene lugar en disoluciones concentradas donde la distancia entre las moléculas de fluoróforo es comparable a una distancia característica R_0 , la cual se encuentra en torno a los 40Å. Se necesitan concentraciones en el rango milimolar para alcanzar esta distancia media. Por tanto, como las concentraciones que se necesitan para las medidas de fluorescencia están en el rango de 10^{-6} M el efecto de RET se puede eliminar fácilmente haciendo uso de disoluciones diluidas.

Una causa trivial de despolarización es el denominado "*radiative transfer*", que consiste en la reabsorción de fotones emitidos. Este fenómeno tiene lugar a concentraciones inferiores a las necesarias para el RET y es por ello más difícil de eliminar. De hecho, "*radiative transfer*" es una causa frecuente de los bajos valores de anisotropía para la fluorescencia debido al solapamiento espectral.

En general se puede afirmar que para soluciones diluidas y de baja viscosidad la anisotropía depende principalmente del movimiento rotacional del fluoróforo, de manera que todos aquellos factores que afecten al tiempo de correlación rotacional afectarán a la magnitud de la anisotropía. Para pequeños fluoróforos la velocidad de difusión rotacional es normalmente mayor que la velocidad de emisión. Bajo estas condiciones la emisión se encuentra despolarizada y la anisotropía es próxima a cero. Para proteínas marcadas este movimiento depende del tamaño, de la forma de la proteína y de su estado de agregación,

entre otros factores. La dependencia de la anisotropía con el movimiento rotacional ha dado lugar a numerosas aplicaciones en investigación bioquímica, algunas de las cuales se recogen a continuación.

3.3.3. Aplicaciones.

Una de las principales aplicaciones que presenta la anisotropía de fluorescencia es el estudio de **interacciones moleculares**. A continuación, con un ejemplo sencillo, se describe como afectan las interacciones moleculares a la magnitud de la anisotropía de fluorescencia. Como ya se ha comentado las moléculas en solución se encuentran en movimiento. En el caso de moléculas de pequeño tamaño este movimiento es muy rápido, de manera que si se excita con luz polarizada la emisión va a estar despolarizada. Sin embargo, cuando esta molécula se une a un receptor (proteína) el movimiento de este conjugado se encuentra restringido, lo que hace que sea más lento. Cuando este conjugado se excita con luz polarizada la luz emitida es obviamente menos despolarizada. La diferencia entre estos dos estados depende del número de moléculas unidas y de la constante de unión.

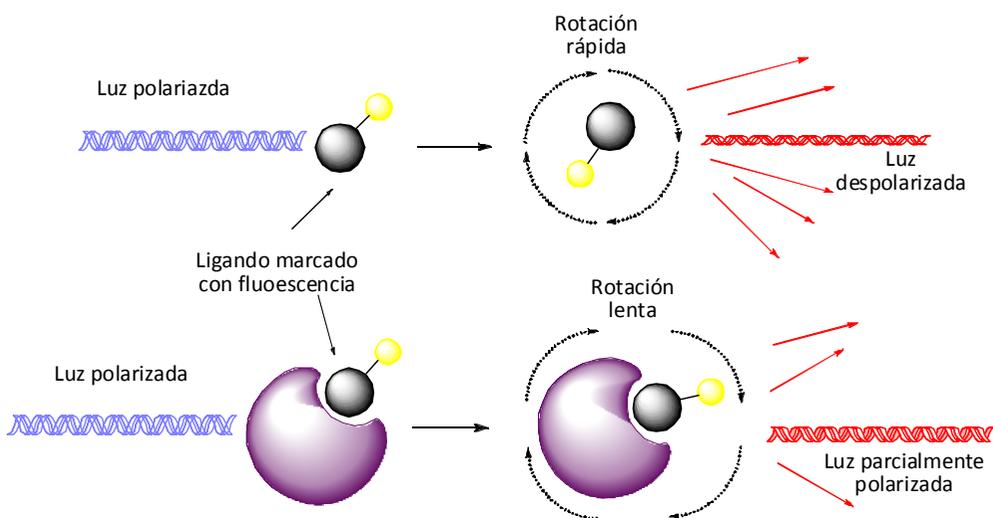


Figura 3.7. Representación esquemática de cómo se ve afectada la anisotropía de una molécula al unirse a su receptor.

La anisotropía de fluorescencia se puede utilizar para analizar las interacciones moleculares tipo DNA-proteína^{335,336}, RNA-proteína³³⁷, proteína-proteína^{338,339}, ligando-proteína³⁴⁰ y antígeno-anticuerpo^{341,342} (inmunoensayos). Dado que los ensayos de anisotropía de fluorescencia no requieren la separación de fluoróforo libre y el ligado y las medidas se llevan a cabo en solución, es posible trabajar en condiciones de equilibrio real. Además, las medidas de anisotropía de fluorescencia no alteran las muestras, por lo que pueden ser tratadas y analizadas de nuevo para ver el efecto que tiene sobre la unión parámetros como el pH, la temperatura o la fuerza iónica. Además, como pueden llevarse a cabo en tiempo real permiten realizar análisis cinéticos de los procesos de asociación y disociación.

Existen **otras aplicaciones** destacables de la anisotropía de fluorescencia. La acción de enzimas degradativas, como las proteasas^{343,344}, las DNAsas³⁴⁵ o las RNAsas³⁴⁶ dan lugar a cambios en el tamaño molecular, de manera que puede ser seguida por anisotropía de fluorescencia. También se ha utilizado en el análisis de

335. LiCata, V. J.; Wowor, A. J., Applications of fluorescence Anisotropy to the study of Protein-DNA interactions. *Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 in Vitro Techniques* **2008**, 84, 243-262.

336. Pavski, V.; Le, X. C., Ultrasensitive protein-DNA binding assays. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, (1), 65-73.

337. Wilson, G. M., RNA folding and RNA-protein binding analyzed by fluorescence anisotropy and resonance energy transfer. *Reviews in Fluorescence 2005* **2005**, 2, 223-243.

338. Letilly, V.; Royer, C. A., Fluorescence anisotropy assays implicate protein-protein interactions in regulating trp repressor dna-binding. *Biochemistry* **1993**, 32, (30), 7753-7758.

339. Park, S.-H.; Raines, R. T., Fluorescence polarization assay to quantify protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **2004**, 261, 161-6.

340. Kakehi, K.; Oda, Y.; Kinoshita, M., Fluorescence polarization: Analysis of carbohydrate-protein interaction. *Analytical Biochemistry* **2001**, 297, (2), 111-116.

341. Kingery, J. R.; Sowinski, K. M.; Kraus, M. A.; Klaunig, J. E.; Mueller, B. A., Vancomycin assay performance in patients with end-stage renal disease receiving hemodialysis. *Pharmacotherapy* **2000**, 20, (6), 653-656.

342. Wei, A. P.; Herron, J. N., Use of synthetic peptides as tracer antigens in fluorescence polarization immunoassays of high-molecular-weight analytes. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, (23), 3372-3377.

343. Blommel, P. G.; Fox, B. G., Fluorescence anisotropy assay for proteolysis of specifically labeled fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **2005**, 336, (1), 75-86.

344. Bolger, R.; Checovich, W., A new protease activity assay using fluorescence polarization. *Biotechniques* **1994**, 17, (3), 585-589.

345. Yonemura, K.; Maeda, H., A new assay-method for DNase by fluorescence polarization and fluorescence intensity using dna-ethidium bromide complex as a sensitive substrate. *Journal of Biochemistry* **1982**, 92, (4), 1297-1303.

346. Bolger, R.; Thompson, D., A quantitative RNase assay using fluorescence polarization. *Am Biotechnol Lab* **1994**, 12, (10), 113, 116.

Capítulo 3

contaminantes³⁴⁷, en la construcción de biosensores³⁴⁸ y en el estudio de membranas biológicas³⁴⁹. En este último caso se mide la anisotropía del fluoróforo en un disolvente de referencia con una viscosidad conocida y en la membrana. La microviscosidad de la membrana se determina a partir de una recta de calibrado a distintas viscosidades.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los campos en los que se ha utilizado esta técnica ha sido en el estudio de las interacciones receptor-ligando, más concretamente ha encontrado aplicación en el estudio de las interacciones lectina-carbohidrato^{340,350}. De las diferentes lectinas estudiadas³⁵¹⁻³⁵⁷ mediante esta técnica, las que más interés han despertado han sido, con diferencia, las

347. Bolger, R.; Wiese, T. E.; Ervin, K.; Nestich, S.; Checovich, W., Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environmental Health Perspectives* **1998**, 106, (9), 551-557.

348. Thompson, R. B., Protein-based biosensors with polarization transduction. *Advanced Concepts in Fluorescence Sensing, Pt B: Macromolecular Sensing* **2005**, 10, 1-19.

349. Mykytczuk, N. C. S.; Trevors, J. T.; Leduc, L. G.; Ferroni, G. D., Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **2007**, 95, 60-82.

350. Oda, Y.; Kinoshita, M.; Nakayama, K.; Kakehi, K., Evaluation of fluorescence polarization method for binding study in carbohydrate-lectin interaction. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **1998**, 21, (11), 1215-1217.

351. Khan, M. I.; Mathew, M. K.; Balaram, P.; Surolia, A., Fluorescence-polarization studies on binding of 4-methylumbelliferyl beta-d-galactopyranoside to ricinus-communis (castor-bean) agglutinin. *Biochemical Journal* **1980**, 191, (2), 395-400.

352. Khan, M. I.; Surolia, N.; Mathew, M. K.; Balaram, P.; Surolia, A., Fluorescence polarization as a tool to study lectin-sugar interaction - an investigation of the binding of 4-methylumbelliferyl beta-d-galactopyranoside to abrus-precatorious agglutinin. *European Journal of Biochemistry* **1981**, 115, (1), 149-152.

353. Deboeck, H.; Loontjens, F. G.; Delmotte, F. M.; Debruyne, C. K., The use of 4-methylumbelliferyl glycosides in binding-studies with the lectins BS I-a-4, BS I-B-4 and BS II from *bandeiraea-(griffonia)-simplicifolia*. *Febs Letters* **1981**, 126, (2), 227-230.

354. Weinhold, E. G.; Knowles, J. R., Design and evaluation of a tightly binding fluorescent ligand for influenza-a hemagglutinin. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, 114, (24), 9270-9275.

355. Jacob, G. S.; Kirmaier, C.; Abbas, S. Z.; Howard, S. C.; Steininger, C. N.; Welply, J. K.; Scudder, P., Binding of sialyl-lewis-x to e-selectin as measured by fluorescence polarization. *Biochemistry* **1995**, 34, (4), 1210-1217.

356. Oda, Y.; Nakayama, K.; Abdul-Rahman, B.; Kinoshita, M.; Hashimoto, O.; Kawasaki, N.; Hayakawa, T.; Kakehi, K.; Tomiya, N.; Lee, Y. C., Crocus sativus lectin recognizes Man(3)GlcNAc in the N-glycan core structure. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, (35), 26772-26779.

357. Kakehi, K.; Kinoshita, M.; Oda, Y.; Abdul-Rahman, B., Lectin from bulbs of *Crocus sativus* recognizing N-linked core glycan: Isolation and binding studies using fluorescence polarization. In *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems Pt a: General Procedures*, Academic Press Inc: San Diego, 2003; Vol. 362, pp 512-522.

galectinas³⁵⁸⁻³⁶⁸. No sólo se han desarrollado glicoconjugados fluorescentes (**figura 3.8.**, compuestos **80, 81, 82**) que permiten el estudio de su interacción con diferentes galectinas mediante anisotropía de fluorescencia sino que, además, estos glicoconjugados han sido utilizados para estudiar la afinidad de diferentes neoglicoconjugados no fluorescentes hacia estas lectinas a través de ensayos de competición.

-
- 358.** Sorme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Wellmar, U.; Magnusson, B. G.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Design and synthesis of galectin inhibitors. In *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems, Part B: Specific Applications*, Academic Press Inc: San Diego, 2003; Vol. 363, pp 157-169.
- 359.** Sorme, P.; Kahl-Knutson, B.; Wellmar, U.; Nilsson, U. J.; Leffler, H., Fluorescence polarization to study galectin-ligand interactions. In *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems Pt a: General Procedures*, Academic Press Inc: San Diego, 2003; Vol. 362, pp 504-512.
- 360.** Sorme, P.; Kahl-Knutsson, B.; Huflejt, M.; Nilsson, U. J.; Leffler, H., Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Analytical Biochemistry* **2004**, 334, (1), 36-47.
- 361.** Oberg, C. T.; Carlsson, S.; Fillion, E.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Efficient and expedient two-step pyranose-retaining fluorescein conjugation of complex reducing oligosaccharides: Galectin oligosaccharide specificity studies in a fluorescence polarization assay. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, (6), 1289-1297.
- 362.** Tejler, J.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Synthesis of O-galactosyl aldoximes as potent LacNAc-mimetic galectin-3 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, (9), 2343-2345.
- 363.** Sorme, P.; Arnoux, P.; Kahl-Knutsson, B.; Leffler, H.; Rini, J. M.; Nilsson, U. J., Structural and thermodynamic studies on cation - II interactions in lectin-ligand complexes: High-affinity galectin-3 inhibitors through fine-tuning of an arginine-arene interaction. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (6), 1737-1743.
- 364.** Salameh, B. A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., 3-(1,2,3-Triazol-1-yl)-1-thio-galactosides as small, efficient, and hydrolytically stable inhibitors of galectin-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, (14), 3344-3346.
- 365.** Bergh, A.; Leffler, H.; Sundin, A.; Nilsson, U. J.; Kann, N., Cobalt-mediated solid phase synthesis of 3-O-alkynylbenzyl galactosides and their evaluation as galectin inhibitors. *Tetrahedron* **2006**, 62, (35), 8309-8317.
- 366.** Aplander, K.; Tejler, J.; Toftered, J.; Carlsson, S.; Kahl-Knutsson, B.; Sundin, A.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Synthesis of a 3'-naphthamido-LacNAc fluorescein conjugate with high selectivity and affinity for galectin-3. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (10), 1363-1369.
- 367.** Tejler, J.; Tullberg, E.; Frejd, T.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Synthesis of multivalent lactose derivatives by 1,3-dipolar cycloadditions: selective galectin-1 inhibition. *Carbohydrate Research* **2006**, 341, (10), 1353-1362.
- 368.** Cumpstey, I.; Carlsson, S.; Leffler, H.; Nilsson, U. J., Synthesis of a phenyl thio-beta-D-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, 3, (10), 1922-1932.

En el caso de la ConA, aunque los grupos de Homer³⁶⁹ o Jovin³⁷⁰⁻³⁷² entre otros, han estudiado la interacción de glicoconjugados fluorescentes conteniendo manosa con la ConA mediante ensayos de *quenching* de fluorescencia únicamente el grupo de Kiessling^{373,374} ha llevado a cabo la síntesis de sistemas fluorescentes (**figura 3.8.**, compuesto **79**) para estudiar su interacción con la ConA mediante anisotropía de fluorescencia y para su empleo en ensayos de competición frente a sistemas no fluorescentes.

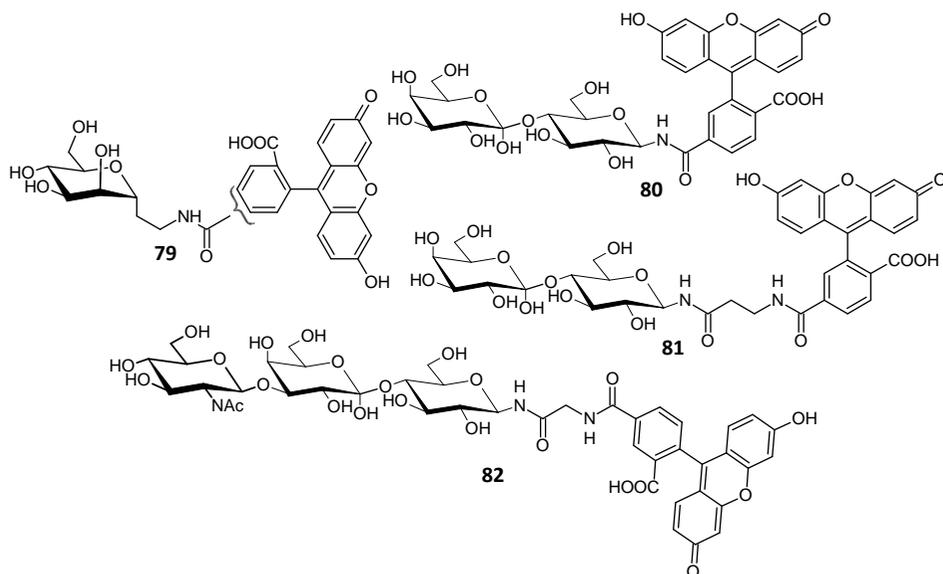


Figura 3.8. Glicoconjugados fluorescentes utilizados en el estudio de interacciones lectina-carbohidrato.

369. Dean, B. R.; Homer, R. B., Use of a fluorescently labeled sugar to investigate binding by Concanavalin A. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1973**, 322, (1), 141-144.

370. Clegg, R. M.; Loontjens, F. G.; Jovin, T. M., Binding of 4-methylumbelliferyl alpha-d-mannopyranoside to dimeric Concanavalin-A - fluorescence temperature-jump relaxation study. *Biochemistry* **1977**, 16, (2), 167-175.

371. Vanlandschoot, A.; Loontjens, F. G.; Clegg, R. M.; Jovin, T. M., Binding-kinetics of 4-methylumbelliferyl alpha-mannobioside to Concanavalin-A by fluorescence stopped-flow measurements. *European Journal of Biochemistry* **1980**, 103, (2), 313-321.

372. Clegg, R. M.; Loontjens, F. G.; Vanlandschoot, A.; Jovin, T. M., Binding-kinetics of methyl alpha-d-mannopyranoside to Concanavalin-A - temperature-jump relaxation study with 4-methylumbelliferyl alpha-d-mannopyranoside as a fluorescence indicator ligand. *Biochemistry* **1981**, 20, (16), 4687-4692.

373. Weatherman, R. V.; Kiessling, L. L., Fluorescence anisotropy assays reveal affinities of C- and O-glycosides for Concanavalin A. *Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, (2), 534-538.

374. Weatherman, R. V.; Mortell, K. I.; Chervenak, M.; Kiessling, L. L.; Toone, E. J., Specificity of C-glycoside complexation by mannose glucose specific lectins. *Biochemistry* **1996**, 35, (11), 3619-3624.

3.3.4. Características y ventajas de los ensayos de anisotropía de fluorescencia.

Existen diferentes ensayos que permiten llevar a cabo estudios de interacción lectina-carbohidrato, entre los que cabe destacar: inhibición de hemoaglutinación, ELLA (*“enzyme-linked lectin assay”*), microcalorimetría isotérmica de titulación (ITC), resonancia de superficie de plasmón SRP), diálisis en equilibrio o RMN. De todos ellos el más comúnmente usado es el ensayo ELLA. Sin embargo, el ensayo de anisotropía de fluorescencia presenta algunas características que lo hacen muy atractivo para el estudio de las interacciones lectina-carbohidrato:

Dada la elevada sensibilidad que presenta la señal de fluorescencia la cantidad de agente fluorescente necesaria es muy baja, pudiendo trabajar a concentraciones del orden de nanomolar. Aunque para establecer la constante de unión lectina-carbohidrato fluorescente se necesiten altas concentraciones de proteína, globalmente la cantidad de lectina necesaria para llevar a cabo los ensayos de competición es mucho menor, lo cual constituye una ventaja frente a los ensayos de RMN, diálisis en equilibrio o calorimetría, que requieren concentraciones altas de proteína, hecho que para algunas proteínas no es factible, bien por su naturaleza o por su disponibilidad. Además, a diferencia de los ensayos tipo ELLA no se necesitan conjugados enzima-lectina, que en muchos casos no son comerciales.

El proceso global es bastante sencillo, simple y rápido ya que sólo hay que poner en contacto la lectina con el glicoconjugado fluorescente y esperar unos minutos para que se alcance el equilibrio y se establezca la señal. Las medidas se llevan a cabo en solución y en condiciones de equilibrio sin necesidad de llevar a cabo separaciones del fluoróforo libre y unido a la proteína, ni etapas de lavado e incubación que pueden afectar al equilibrio, como ocurre en los ensayos tipo ELLA. Además, las medidas se pueden llevar a cabo en placas tipo ELISA, lo que reduce considerablemente el tiempo del ensayo, pero sin la necesidad de recubrir los pocillos con glicopolímeros, que no siempre se encuentran disponibles. El hecho de que sea un ensayo sencillo de llevar a cabo y que no requiere diferentes etapas hace que sea un proceso fácil de automatizar, con todas las ventajas que éso supone.

3.4. Discusión y resultados.

3.4.1. Síntesis de glicoconjugados fluorescentes.

La evaluación de las interacciones carbohidrato-proteína no es trivial a pesar de las diferentes metodologías disponibles. Así, aunque los ensayos de hemoaglutinación son simples no es posible extraer información fiable de los mismos, los ensayos ELLA son tediosos y requieren conjugados lectina-enzima que no siempre son comerciales y por último, los ensayos de ITC y SPC son demasiados sofisticado para ser utilizados como ensayos de rutina.

En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo, a través de diferentes metodologías, la síntesis de multitud de neoglicoconjugados multivalentes conteniendo manosa^{20,375-380}. Dada la necesidad de estudiar la afinidad de estos sistemas frente a la lectina correspondiente, en nuestro caso la ConA, los inconvenientes que presentan los ensayos ELLA y los problemas que nos han surgido a la hora de realizar ese tipo de ensayos nos propusimos llevar a cabo la síntesis de glicoconjugados fluorescentes que nos permitieran establecer la afinidad de estos sistemas multivalentes a través de medidas de anisotropía de fluorescencia.

Por su elevada eficiencia, se eligieron las reacciones de CuAAC para llevar a cabo la síntesis de estos sistemas. En concreto, se aplicó la metodología

375. Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of multivalent neoglycoconjugates by 1,3 dipolar cycloaddition of nitrile oxides and alkynes and evaluation of their lectin-binding affinities. *Tetrahedron* **2005**, 61, (39), 9338-9348.

376. Ferrandiz-Huertas, C.; Isac-García, J.; Perez-Balderas, F.; Santoyo-Gonzalez, F., New synthesis of mannoside-containing neoglycoconjugates by reaction of propargyl mannosides with polyalkylcarboxylated scaffolds. *Synthesis-Stuttgart* **2005**, (6), 939-944.

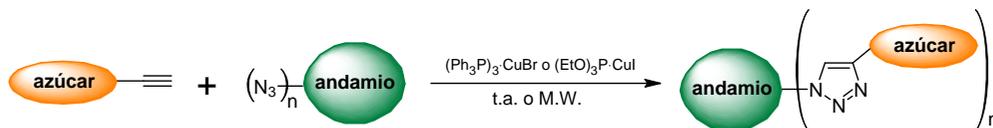
377. Ortega-Caballero, F.; Gimenez-Martinez, J. J.; Garcia-Fuentes, L.; Ortiz-Salmeron, E.; Santoyo-Gonzalez, F.; Vargas-Berenguel, A., Binding affinity properties of dendritic glycosides based on a beta-cyclodextrin core toward guest molecules and concanavalin A. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (23), 7786-7795.

378. Calvo-Flores, F. G.; Isac-García, J.; Hernandez-Mateo, F.; Perez-Balderas, F.; Calvo-Asin, J. A.; Sanchez-Vaquero, E.; Santoyo-Gonzalez, F., 1,3-Dipolar cycloadditions as a tool for the preparation of multivalent structures. *Organic Letters* **2000**, 2, (16), 2499-2502.

379. Saitz-Barria, C.; Torres-Pinedo, A.; Santoyo-Gonzalez, F., Synthesis of bridged thiourea calix-sugar. *Synlett* **1999**, (12), 1891-1894.

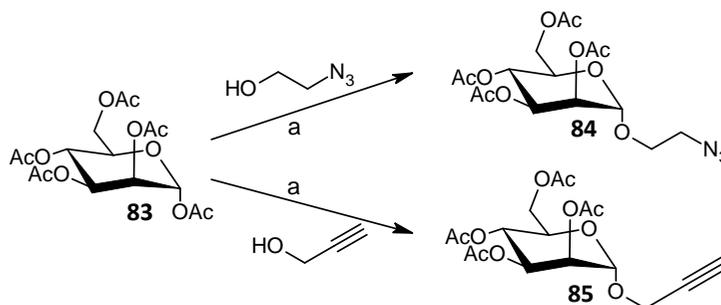
380. Garcia-Lopez, J. J.; Hernandez-Mateo, F.; Isac-García, J.; Kim, J. M.; Roy, R.; Santoyo-Gonzalez, F.; Vargas-Berenguel, A., Synthesis of per-glycosylated beta-cyclodextrins having enhanced lectin binding affinity. *Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, (2), 522-531.

desarrollada por nuestro grupo de investigación para la síntesis de neoglicoconjugados multivalentes²⁰ (**esquema 3.1.**), con la única peculiaridad de que no se hizo uso de una base ya que los tiempos de reacción seguían siendo cortos aún en ausencia de la misma.



Esquema 3.1. Síntesis de sistemas multivalentes mediante CuAAC.

Para abordar la síntesis, dado que la lectina objetivo era la ConA, se utilizaron el 2-azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido **84**³⁸¹ y el 2-propinil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido **85**³⁸² como ligandos, que se obtuvieron mediante glicosidación de la correspondiente manosa per-O-acetilada **83** con 2-azido etanol³⁸³ y alcohol propargílico, respectivamente, catalizada por $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.



Esquema 3.2. Condiciones: (a) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Cl_2CH_2 anhidro, 2 días, t.a.

381. Chernyak, A. Y.; Sharma, G. V. M.; Kononov, L. O.; Krishna, P. R.; Levinsky, A. B.; Kochetkov, N. K.; Rao, A. V. R., 2-Azidoethyl glycosides - glycosides potentially useful for the preparation of neoglycoconjugates. *Carbohydrate Research* **1992**, 223, 303-309.

382. Mereyala, H. B.; Gurralla, S. R., A highly diastereoselective, practical synthesis of allyl, propargyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-beta-D-gluco, beta-D-galactopyranosides and allyl, propargyl heptaacetyl-beta-D-lactosides. *Carbohydrate Research* **1998**, 307, (3-4), 351-354.

383. Lu, X. Q.; Bittman, R., Synthesis of a photoactivatable (2S,3R)-sphingosylphosphorylcholine analogue. *Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, (12), 4746-4750.

En la **figura 3.9**, se recogen los fluoróforos, convenientemente derivatizados, que han sido empleados en la síntesis de los glicoconjugados fluorescentes. El azido derivado del dansilo **63** y de la fluoresceína **67** ya fueron utilizados en el **capítulo 2** para la síntesis de los agentes de etiquetado doble **68** y **69**. El propargil derivado del dansilo **86**³⁸⁴ se obtuvo en las mismas condiciones que **63** pero utilizando propargilamina en lugar de 2-azidoetilamina.

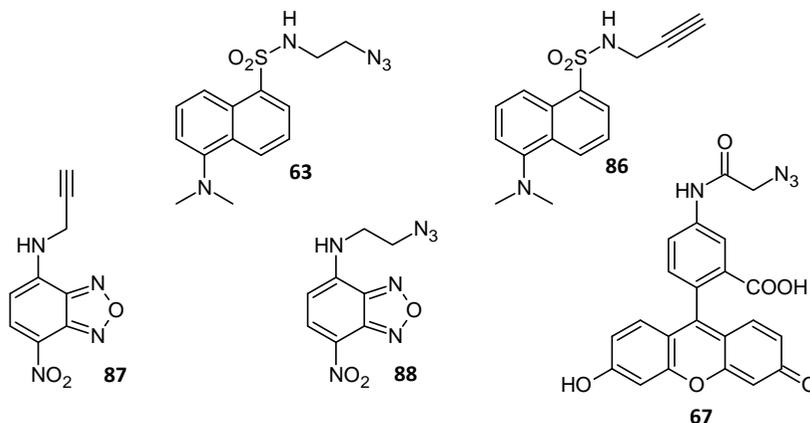
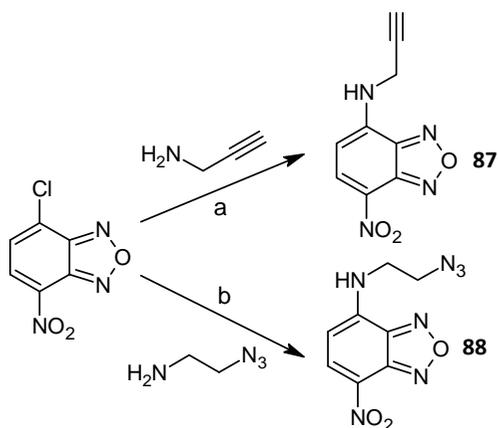


Figura 3.9. Azido y propargil derivados fluorescentes empleados en las síntesis.

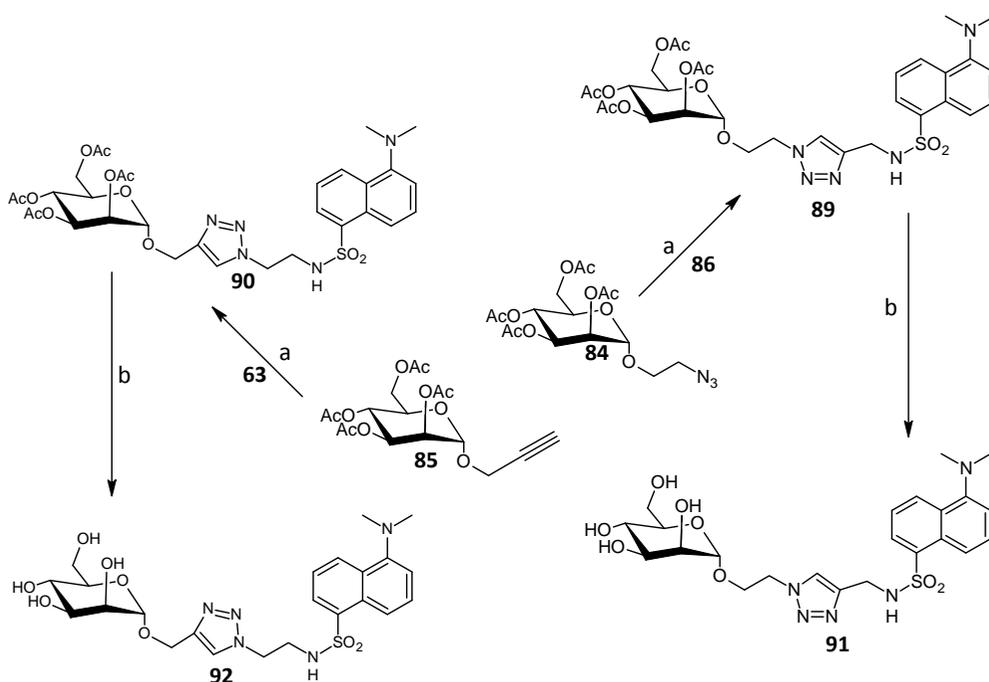
Para la obtención de los derivados de NBD se partió del cloruro de NBD, que es comercial, y se hizo reaccionar con las correspondientes aminas, tal como se muestra en el **esquema 3.3**, lo que nos condujo a **87** y **88** con muy buenos rendimientos.



Esquema 3.3. Condiciones: MeOH, t.a.; (a) 3 horas, 76%; (b) 2 horas, 80%.

384. Bolletta, F.; Fabbri, D.; Lombardo, M.; Prodi, L.; Trombini, C.; Zaccheroni, N., Synthesis and photophysical properties of fluorescent derivatives of methylmercury. *Organometallics* **1996**, 15, (9), 2415-2417.

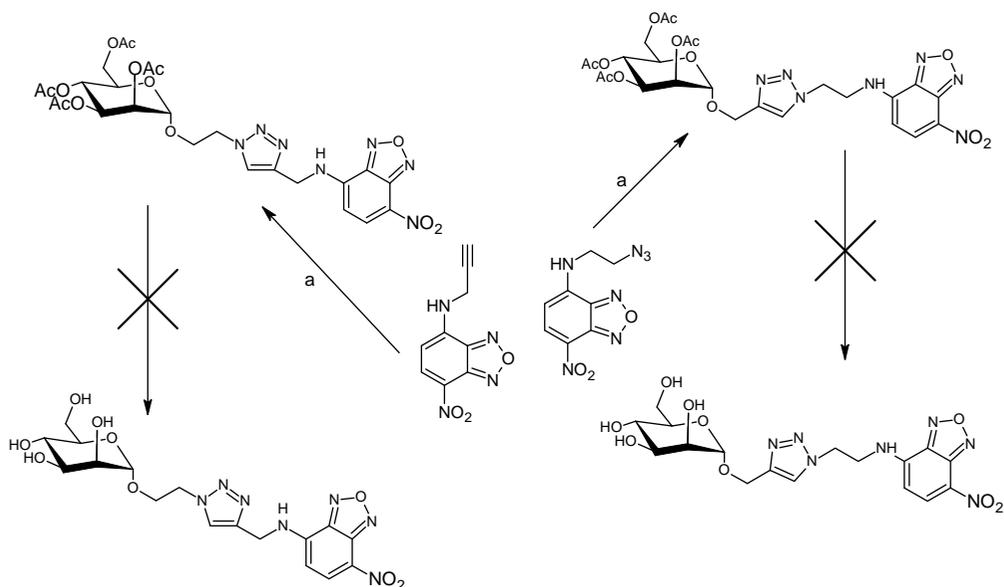
Una vez sintetizados los correspondientes azido y alquino derivados el siguiente paso fue la reacción entre ellos para obtener los diferentes sistemas fluorescentes. Se comenzó por la reacción de **84** y **85** con los correspondientes derivados del dansilo, **86** y **63** respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo en tolueno, utilizando $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ como catalizador y bajo irradiación de M.W., obteniéndose los compuestos **89** y **90** con excelentes rendimientos (**esquema 3.4.**). La des-O-acetilación de los productos, necesaria para medir su afinidad frente a la ConA, se llevó a cabo a 50°C en MeOH y utilizando Et_3N como base, obteniéndose **91** y **92** respectivamente.



Esquema 3.4: Condiciones: (a) tolueno, $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$, M.W. (500W, 100°C , 50min); **89** 95%; **90** 99%; (b) MeOH, Et_3N , 50°C , una noche; **91** 91%; **92** 91%.

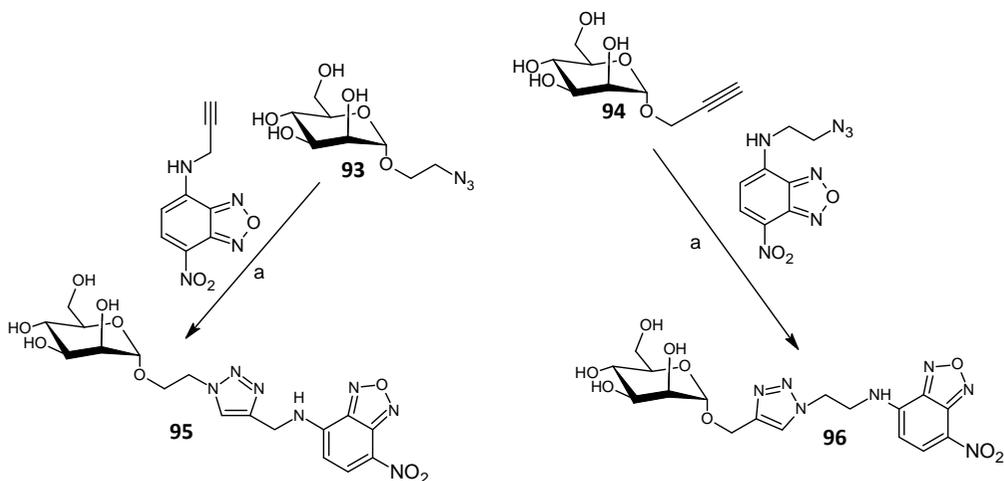
Para los derivados de NBD se intentó seguir el mismo esquema sintético, sin embargo, la etapa de des-O-acetilación presentó bastantes problemas. Independientemente de la base utilizada (Et_3N , MeONa..) no se consiguió aislar los productos deseados. Con posterioridad y en otro tipo de reacciones se ha observado que los derivados de NBD son bastante sensibles a las bases, lo que explica este resultado.

Capítulo 3



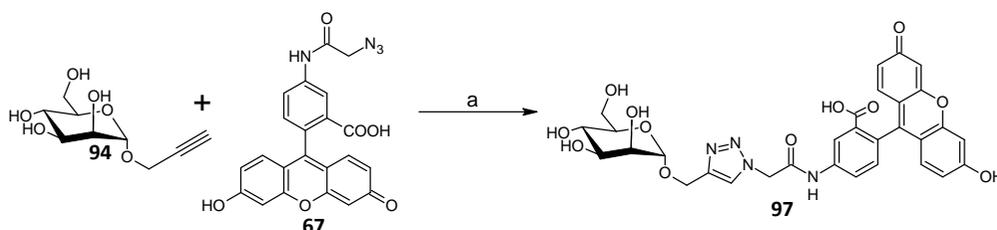
Esquema 3.5. Condiciones: (a) tolueno, $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, M.W.(80°C, 500W, 50min).

Para solventar este problema se optó por des-O-acetilar previamente los derivados **84** y **85** y llevar a cabo las reacciones de CuAAC con los compuestos hidroxilados. Las reacciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones que en el caso anterior, es decir, con $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$ como catalizador y bajo irradiación de M.W., pero como disolvente se utilizó DMF, dada la insolubilidad de los azúcares des-O-acetilados en tolueno (**esquema 3.6.**).



Esquema 3.6.: Condiciones: (a) DMF, $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, M.W.(500W, 80°C, 30min); **95** 98%; **96** 93%.

Debido a los excelentes resultados obtenidos para los derivados de NBD y a que mediante esta metodología se evita la necesidad de una segunda etapa de des-O-acetilación se utilizaron estas mismas condiciones para la síntesis del glicoconjugado de la fluoresceína **97**, tal y como se indica en el **esquema 3.7**.



Esquema 3.7.: Condiciones: (a) DMF, $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, M.W.(500W, 80°C, 30min),78%.

3.4.2. Estudios de afinidad de los glicoconjugados fluorescentes con la ConA mediante anisotropía de fluorescencia. Empleo del glicoconjugado fluorescente **97** en ensayos de competición.

La interacción de los glicoconjugados **91**, **92**, **95**, **96** y **97** con la lectina ConA se estudió a concentraciones constantes de estos compuestos (0.2 μM para **97**, 10 μM para **91** y **92** y 2 μM para **95** y **96**) en presencia de concentraciones variables de la lectina ConA (0-240 μM) en tampón HEPES 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Ca^{+2} 1 mM y Mn^{+2} 1 mM. Tras 30 min de incubación (que es el tiempo que se tarda en preparar las disoluciones, pues a través de medidas puntuales se ha podido comprobar que el equilibrio se alcanza en pocos minutos) se midió la anisotropía de fluorescencia de cada una de estas disoluciones a diferentes temperaturas. La temperatura es un factor que hay que controlar ya que no sólo afecta al equilibrio, y por tanto a la constante de unión, sino que también afecta a la movilidad de las moléculas en solución, lo que implica variaciones en la anisotropía de las mismas. En concreto se llevaron a cabo las medidas a 10, 20 y 30°C.

En todos los casos se observa un incremento en la anisotropía de fluorescencia al aumentar la concentración de proteína presente en solución, lo que indica que estos glicoconjugados interaccionan con la ConA, como cabría esperar. En el derivado de fluoresceína **97** se produce además un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia (12%) que entra dentro de los límites de tolerancia esta técnica³⁵⁴ sin necesidad de hacer ningún tipo de corrección. Sin embargo, en el caso de los glicoconjugados **91** y **92**, que contienen dansilo, este

Capítulo 3

aumento es significativamente superior (40%), hecho que ya había sido observado con anterioridad por Shinkai y col.²⁶⁸. Para los derivados de NBD **95** y **96** la intensidad no se ve afectada, incluso a elevadas concentraciones de ConA.

Para todos los glicoconjugados y diferentes temperaturas se analizaron los valores de anisotropía en función de la concentración de ConA monomérica. Los resultados se resumen en las **figura 3.10**.

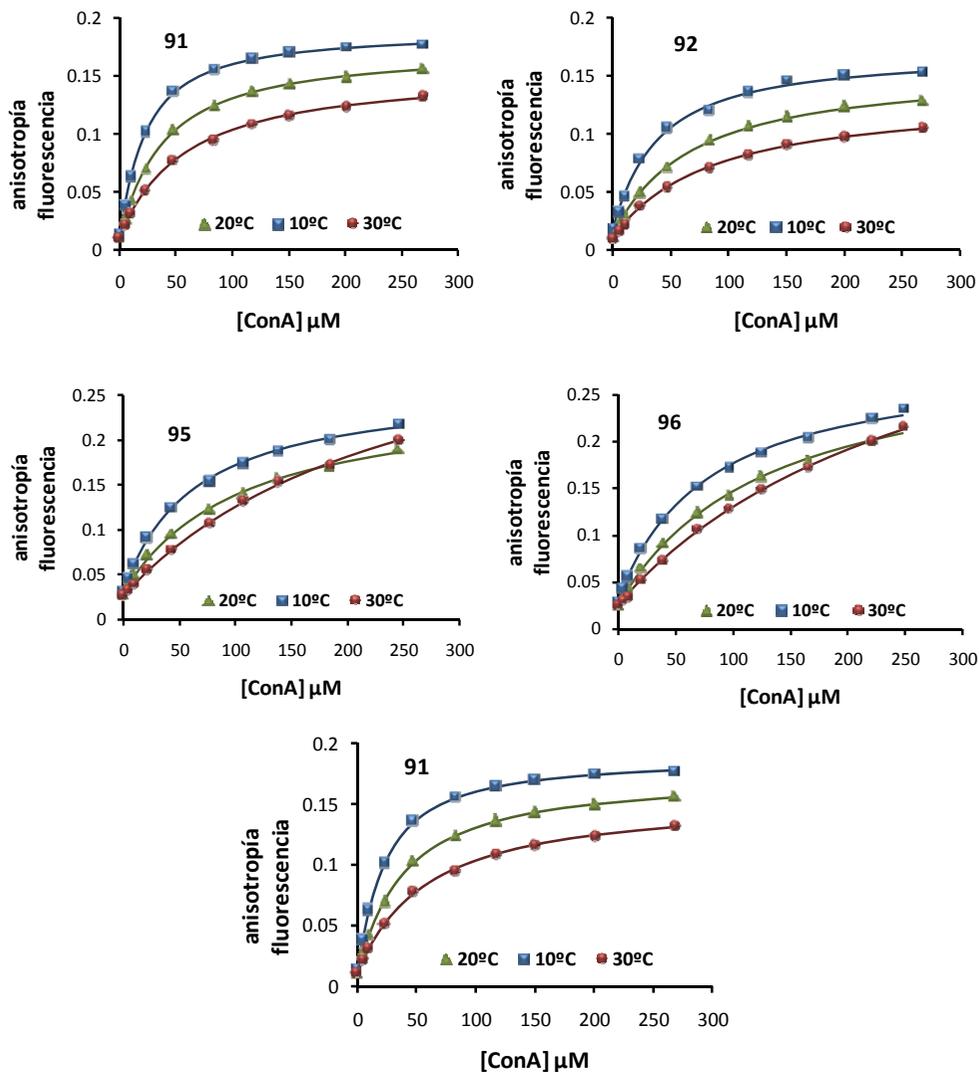


Figura 3.10. Representaciones de los datos de anisotropía (r) de los glicoconjugados **91**, **92**, **95**, **96** y **97** en presencia de cantidades crecientes de ConA (0-240 μM) en tampón HEPES 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Ca^{+2} 1 mM y Mn^{+2} 1 mM, a distintas temperaturas y su ajuste a la **ecuación 3.10**.

El análisis gráfico revela que, en términos generales, la variación de la temperatura ejerce dos efectos sobre las curvas³⁵⁹:

- ✓ Desplazamiento a lo largo del eje x al aumentar la temperatura que refleja un cambio en K_d . Así, K_d aumenta con la temperatura.
- ✓ El valor máximo de anisotropía (r_{max}) aumenta al disminuir la temperatura. Ésto se debe a una ralentización del movimiento de las moléculas debida a la propia temperatura y al incremento que se produce en la viscosidad del agua.

Los datos experimentales se ajustaron a la **ecuación 3.10**.^{355,360,385}, correspondiente a una interacción 1:1, donde r_0 es el valor de la anisotropía en ausencia de proteína, r_{max} es el máximo valor que alcanza este parámetro al aumentar la concentración de proteína, K_d es la constante de disociación y $[P]$ es la concentración de proteína libre.

$$r = r_0 + (r_{max} - r_0) \times \left(\frac{[P]}{K_d + [P]} \right)$$

Ecuación 3.10.

Aunque la ConA sea un tetrámero cada monómero es capaz de unir una unidad de azúcar, de manera que para simplificar los cálculos la consideraremos como monomérica. Los resultados obtenidos tras realizar estos ajustes se recogen en la **tabla 3.4**.

Glicoconjugado	K_d μ M (10°C)	K_d μ M (20°C)	K_d μ M (30°C)
97	23.3±0.3	36.1±0.2	64.1±0.7
91	18.4±0.2	34.0±0.4	52.5±0.9
92	33.2±1.0	61.3±0.9	78.00±1.8
95	62.3±1.0	102.6±2.5	253.7±7.6
96	75.5±1.5	127.7±2.9	284.3±9.5

Tabla3.4. Valores de las constantes de disociación K_d para la interacción de los glicoconjugados fluorescentes **91**, **92**, **95**, **96** y **97** con la lectina ConA en tampón HEPES 50 mM pH 7.2, NaCl 150 mM, Ca^{+2} 1 mM y Mn^{+2} 1 mM obtenidas a partir de la **ecuación 3.10**.

385. Cobos, E. S.; Pisabarro, M. T.; Vega, M. C.; Lacroix, E.; Serrano, L.; Ruiz-Sanz, J.; Martinez, J. C., A miniprotein scaffold used to assemble the polyproline II binding epitope recognized by SH3 domains. *Journal of Molecular Biology* **2004**, 342, (1), 355-365.

Es bien conocido que la presencia de un grupo aromático en la posición anomérica de la α -manosa conduce a un incremento de la constante de interacción con la ConA y con otras lectinas de características similares^{386,387}. Por ejemplo, la capacidad inhibitoria del p-nitrofenil α -D-manopiranosido es prácticamente el doble que la de su análogo metílico³⁸⁸. Este hecho se ha relacionado con un efecto de carácter hidrofóbico derivado del establecimiento de una red de interacciones π - π entre el aglicón arílico y una región hidrofóbica cercana al sitio de unión de la ConA³²¹. Estas interacciones hidrofóbicas pueden justificar la elevada afinidad de la ConA por el glicoconjugado **97** con respecto al metil α -D-manopiranosido (117.6-121.9 μ M a 25°C).

Para los derivados de NBD (**95** y **96**) no se observa este aumento en la afinidad, de hecho presentan una constante de unión muy similar a la del metil α -D-manopiranosido, por lo que parece probable que la parte aromática de los glicoconjugados no se encuentre en una disposición adecuada o no posea la densidad electrónica favorable para interactuar con este bolsillo hidrofóbico y provocar ese aumento de afinidad que se observa en el caso de **97**. Destacar que las constantes que se obtienen a 30°C son excesivamente altas (afinidad muy baja). Ésto es debido a que para estos compuestos y en las condiciones en las que se ha trabajado no se ha llegado a alcanzar el plató de las curvas a 30°C (la solubilidad de la ConA no permite alcanzar las concentraciones necesarias para alcanzar este plató) lo que hace que el ajuste de los valores obtenidos lleven asociados una gran imprecisión.

En el caso de los glicoconjugados **91** y **92** parece probable que presenten una afinidad superior a la del metil α -D-manopiranosido, aunque nuestros resultados no lo demuestran con absoluta certeza pues las constantes obtenidas se encuentran sobreestimadas, a pesar de que el ajuste es bueno, ya que no se ha tenido en cuenta el aumento en la intensidad de fluorescencia que sufren estos compuestos al unirse a la ConA (hecho que complica enormemente los cálculos). Probablemente las interacciones hidrofóbicas anteriormente mencionadas sean las

386. Loontjens, F. G.; Vanwauwe, J. P.; Degussem, R.; Debruyne, C. K., Binding of para-substituted phenyl glycosides to Concanavalin-A. *Carbohydrate Research* **1973**, 30, (1), 51-62.

387. Vanwauwe, J. P.; Loontjens, F. G.; Carchon, H. A.; Debruyne, C. K., Binding of para substituted-phenyl glycosides to lectins from pea and lentil. *Carbohydrate Research* **1973**, 30, (2), 249-256.

388. Page, D.; Zanini, D.; Roy, R., Macromolecular recognition: Effect of multivalency in the inhibition of binding of yeast mannan to concanavalin A and pea lectins by mannosylated dendrimers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, 4, (11), 1949-1961.

responsables de ese aumento en la intensidad de fluorescencia, como apuntan Decastel y col³⁸⁹. para un glicoconjugado fluorescente similar.

Aunque los valores de las constantes de afinidad de los compuestos **91** y **92** se encuentran sobrestimadas lo que sí se observa es $K_d(\mathbf{91}) > K_d(\mathbf{92})$ y $K_d(\mathbf{95}) > K_d(\mathbf{96})$, siendo **91** y **95** los glicoconjugados que proceden del azidoetil manósido y **92** y **96** los que se han sintetizado a partir del propargil manósido.

Para comprobar la aplicabilidad de estos compuestos en el establecimiento de las constantes de unión de otros ligandos no fluorescentes se realizaron ensayos de competición frente al metil α -D-manopiranosido. Para ello se registró la anisotropía de fluorescencia de disoluciones de concentración constante del glicoconjugado fluorescente y de ConA en presencia de concentraciones variables del ligando cuya afinidad se pretende establecer. Se trabajó a una concentración de proteína que proporcionaba una señal suficientemente alta (en ausencia de inhibidor) para así tener un rango de medida fiable³⁶⁰ (por encima de 50 mA). Los ensayos se llevaron a cabo con el compuesto **97** (0.2 μ M), ya que al ser el que presenta una mayor afinidad permite trabajar a concentraciones de ConA más bajas, en concreto entre 14-18 μ M, y se trabajó con concentraciones de metil α -D-manopiranosido entre 0 y 1 mM. Además, para estudiar si la naturaleza del tampón ejercía alguna influencia sobre el resultado las medidas se llevaron a cabo en dos tampones diferentes (tampón HEPES y fosfato 50 mM pH 7.2).

En este caso, a medida que aumenta la concentración del ligando en solución se observa una disminución de la señal de anisotropía. Esta despolarización es el resultado del desplazamiento del glicoconjugado **97** del sitio de unión de la ConA en presencia de metil α -D-manopiranosido. Para estos ensayos de competición se pueden llevar a cabo dos ajustes diferentes que permiten estimar el IC_{50} del nuevo ligando o inhibidor (**ecuación 3.11.**³⁶⁰) y su constante de disociación (**ecuación 3.12.**^{354,373}).

389. Decastel, M.; Vincent, M.; Matta, K. L.; Frenoy, J. P., 4-Methylumbelliferyl-glycosides as fluorescence probes of sugar-binding sites on lectin molecules - spectral properties and dependence of fluorescence on polarity and viscosity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1984**, 232, (2), 640-653.

$$r = r_{no-inh} - (r_{no-inh} - r_o) \times \left(\frac{[L]}{IC_{50} + [L]} \right)$$

Ecuación 3.11.

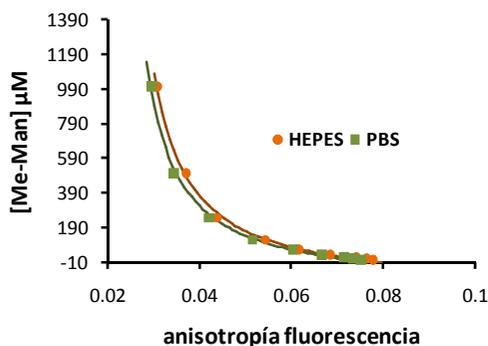
Donde r_{no-inh} es el valor de anisotropía en ausencia de inhibidor, r_o es el valor e anisotropía en ausencia de inhibidor y proteína y $[L]$ es la concentración de ligando no fluorescente.

$$[L]_T = \frac{K_l}{K_f} \left([P]_T \frac{(r_B - r)}{(r - r_F)} - [F]_T \frac{(r_B - r)}{(r_B - r_F)} \right) - K_l$$

Ecuación 3.12.

Donde $[L]_T$, $[P]_T$ y $[F]_T$ son las concentraciones totales de ligando, proteína y compuesto fluorescente, respectivamente, K_l es la constante de disociación del nuevo ligando y K_f es la constante de disociación del compuesto fluorescente, cuyo valor se ha determinado previamente.

Los resultados obtenidos para este ensayo de competición frente a metil α -D-manopiranosido se resumen en la **figuras 3.11**.



K _d (μM) 20°C	
HEPES	119.0±6.0
PBS	110.6±10.7

Figura 3.11. Representación de los datos de anisotropía (r) del glicoconjugado **97** en presencia de una concentración constante de ConA ($18.8 \mu\text{M}$) y concentraciones variables de Me-man en tampón HEPES y tampón PBS, su ajuste a la **ecuación 3.12**, y los valores de las constantes de disociación para el Me-man obtenidas a través de esos ajustes.

Las constantes de interacción K_d para el metil α -D-manopiranosido en los dos tampones son significativamente similares entre sí, lo que indica que los resultados son independientes del tampón utilizado, y similares a las que

encontramos en bibliografía para este ligando obtenidas mediante microcalorimetría³⁹⁰⁻³⁹² por diferentes grupos (117.6-121.9 μM a 25°C).

Cuando se intentaron llevar a cabo ensayos de competición con ligandos multivalentes éstos provocaron la agregación y precipitación de la ConA, como cabría esperar a pH 7.2 ya que en estas condiciones se encuentra como tetrámero. Aunque esta precipitación por entrecruzamiento parece no afectar a otras técnicas, como la calorimetría, en este caso sí que influye ya que al precipitar no sólo se elimina proteína del medio sino que también desaparece glicoconjugado fluorescente, cuya señal es la que se registra.

Para intentar medir la afinidad de este tipo de sistemas se llevaron a cabo estos estudios a pH 5.2 al cual la ConA se encuentra como dímero y esta precipitación no está tan favorecida. En primer lugar se determinó la constante de disociación del glicoconjugado **97** a 20°C y pH 5.2 que son las condiciones en las que se realizarán los estudios de competición con ligandos multivalentes. Se obtuvo un valor K_d 40.44 \pm 0.81, muy similar al obtenido a pH 7.2 lo que indica que, al menos para ligandos monovalentes, la afinidad no se ve afectada ni por la naturaleza del tampón ni por el pH del medio.

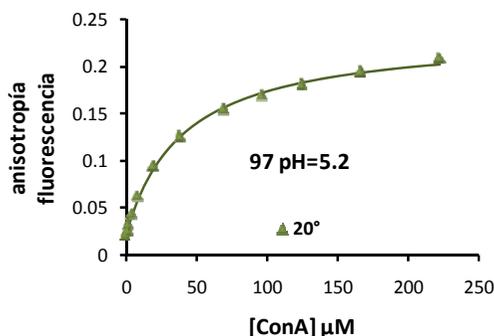


Figura 3.12. Representación de los datos de anisotropía (r) del glicoconjugado **97** en presencia de cantidades crecientes de ConA (0-240 μM) en tampón acetato 50 mM pH 5.2, NaCl 150 mM, Ca^{+2} 1 mM y Mn^{+2} 1 mM, a 20°C y su ajuste a la **ecuación 3.10**.

390. Mandal, D. K.; Brewer, C. F., Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin-A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin-A with large oligomannose-type glycopeptides. *Biochemistry* **1993**, 32, (19), 5116-5120.

391. Mandal, D. K.; Kishore, N.; Brewer, C. F., Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions - titration microcalorimetry measurements of the binding of n-linked carbohydrates and ovalbumin to Concanavalin-a. *Biochemistry* **1994**, 33, (5), 1149-1156.

392. Chervenak, M. C.; Toone, E. J., Calorimetric analysis of the binding of lectins with overlapping carbohydrate-binding ligand specificities. *Biochemistry* **1995**, 34, (16), 5685-5695.

Capítulo 3

Se llevaron a cabo ensayos de competición con metil α -D- manopiranosido y con los glicoconjugados de manosa que aparecen en la **figura 3.13.**, cuyas afinidades habían sido establecidas previamente por nuestro grupo de investigación a través de ensayos ELLA²⁷¹.

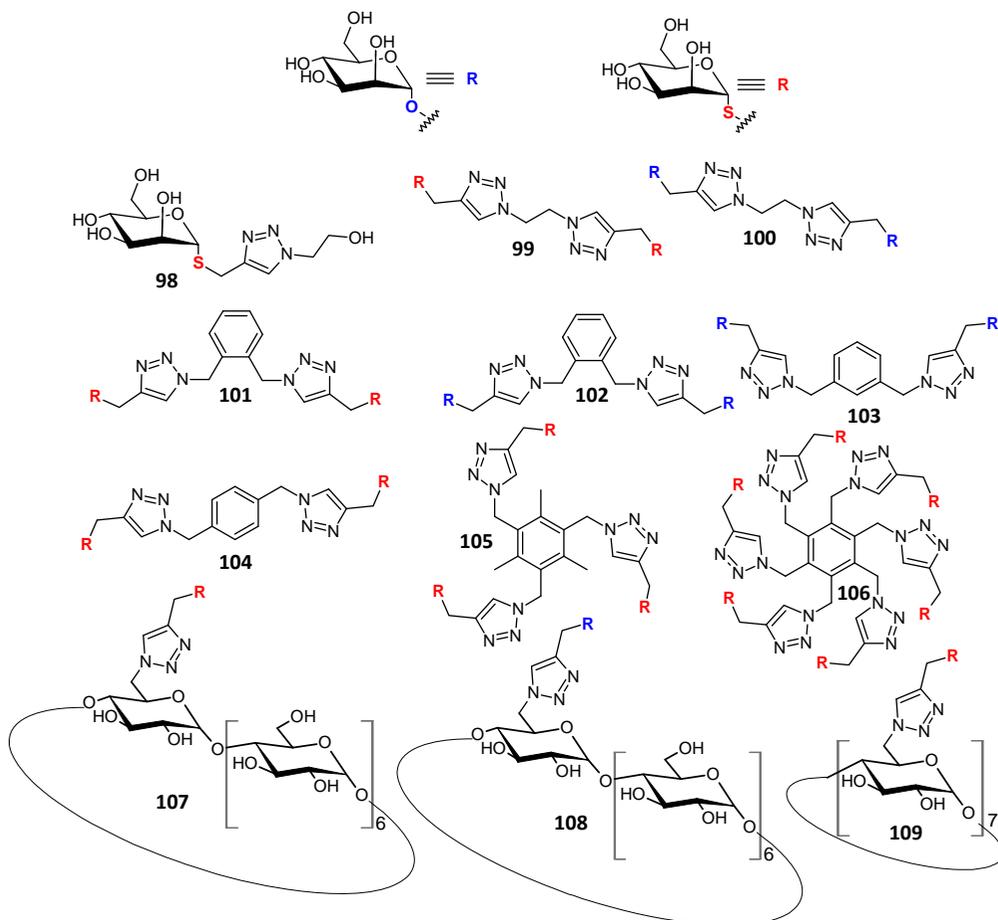


Figura 3.13. Glicoconjugados multivalentes de manosa que han sido utilizados en los ensayos de competición.

La **tabla 3.5.** resume los resultados de los ensayos de competición realizados mediante anisotropía de fluorescencia, utilizando como glicoconjugado fluorescente el compuesto **97**, así como los datos de afinidad relativa previamente obtenidos mediante ensayos ELLA. En ambos casos se ha utilizado como compuesto de referencia el metil α -D-manopiranosido.

Glicoconjugado	IC ₅₀	Afinidad relativa	Afinidad relativa ELLA ²⁷¹	K _d (μM)
Me-man	125.9±2.9	1	1	111.9±6.4
98	123.0±2.8	1.02	0.97	96.7±4.1
100	113.3±2.9	1.11	1.3	88.8±4.6
99	105.9±2.3	1.19	1.36	79.2±4.9
108	100.1±3.7	1.26	1.02	55.6±5.8
107	104.7±4.4	1.20	1.89	60.4±5.9
101	71.2±2.2	1.77	2.27	54.0±2.9
104	66.9±2.2	1.88	2.94	49.9±4.1
102	55.7±1.4	2.26	2.04	40.6±2.3
103	55.3±1.2	2.28	2.41	45.8±4.3
105	64.7±3.3	1.94	7.3	38.2±2.8
106	53.1±1.4	2.37	3.6	37.5±3.6
109	56.0±2.5	2.25	75.7	39.2±3.8

Tabla 3.5. Valores de IC₅₀, afinidades relativas y constantes de disociación K_d para la interacción de los glicoconjugados de la **figura 3.13** con la lectina ConA en tampón acetato 50 mM pH 5.2, NaCl 150 mM, Ca⁺² 1 mM y Mn⁺² 1 mM obtenidas a partir de ensayos de competición y ajuste de los resultados a las **ecuaciones 3.11.** y **3.12.** y afinidades relativas de los mismos glicoconjugados obtenidas a través de ensayos tipo ELLA.

En general las afinidades relativas son análogas a las que proporcionan los ensayos ELLA, siendo ligeramente inferiores las que se obtienen a partir de los ensayos de anisotropía.

Resultan llamativos los resultados obtenidos para los compuestos **105** y **109** para los cuales existen grandes diferencias, sobre todo en el caso de **109**, entre los valores obtenidos mediante ambas técnicas. A raíz de estas observaciones podemos afirmar que existen diferencias muy acusadas en el caso de compuestos multivalentes con **elevadas afinidades**, ya que si observamos el caso de **106**, aunque el compuesto es multivalente la diferencia entre ELLA y anisotropía no es tan significativa.

Estas diferencias **pueden** ser debidas a que al tener sistemas multivalentes de elevada afinidad y una proteína que en realidad es un dímero se producen entrecruzamientos que, aunque no conducen a la precipitación de la proteína dan lugar a la formación de complejos de gran tamaño que tienen una gran influencia

Capítulo 3

sobre las señales de **anisotropía**. Si esto es así, con la formación de estos complejos de gran tamaño se unirían dos efectos, la disminución de la señal como consecuencia del desplazamiento por el nuevo ligando y el aumento de la misma debido a un aumento en el tamaño del complejo, lo que conduce a afinidades por debajo de las reales.

Por otra parte, los ensayos **ELLA** llevados a cabo con glicoconjugados de alta afinidad conducen también a resultados poco fiables⁹⁰. Para este tipo de sistemas se obtienen curvas que se asemejan a dos rectas perpendiculares, una en la que se pasa del 0% de inhibición al máximo y otra que no se ve afectada por la concentración porque ya se ha alcanzado el máximo. Esto se debe a que el ensayo competitivo está totalmente desplazado y el polímero adherido al pocillo no puede competir en afinidad con el glicoconjugado dando como resultado determinaciones de afinidad erróneas.

3.4.3. Síntesis de ciclodextrinas fluorescentes mediante CuAAC.

Debido a la eficiencia de estas reacciones se planteó su empleo para la síntesis de otros sistemas fluorescentes que nos permitieran llevar a cabo estudios del mismo tipo con otras proteínas. Nos decantamos por la MBP porque es una proteína que al ser monomérica no presentará los problemas de agregación y precipitación que encontramos con la ConA. La proteína fue suministrada por el Prof. Rafael Salto con el que colaboramos.

Como ya se ha comentado en la introducción, la MBP es una proteína de unión que presenta afinidad por la maltosa, siendo esta mayor hacia el anómero α que hacia el β . Dada la dificultad de obtener, con buenos rendimientos, el derivado propargilado o el azidoetil derivado de la maltosa en posición α se planteó la obtención de derivados fluorescentes de la β -CD, ya que esta es capaz de unirse a la MBP con una K_d del mismo orden que las maltodextrinas lineales³³⁴.

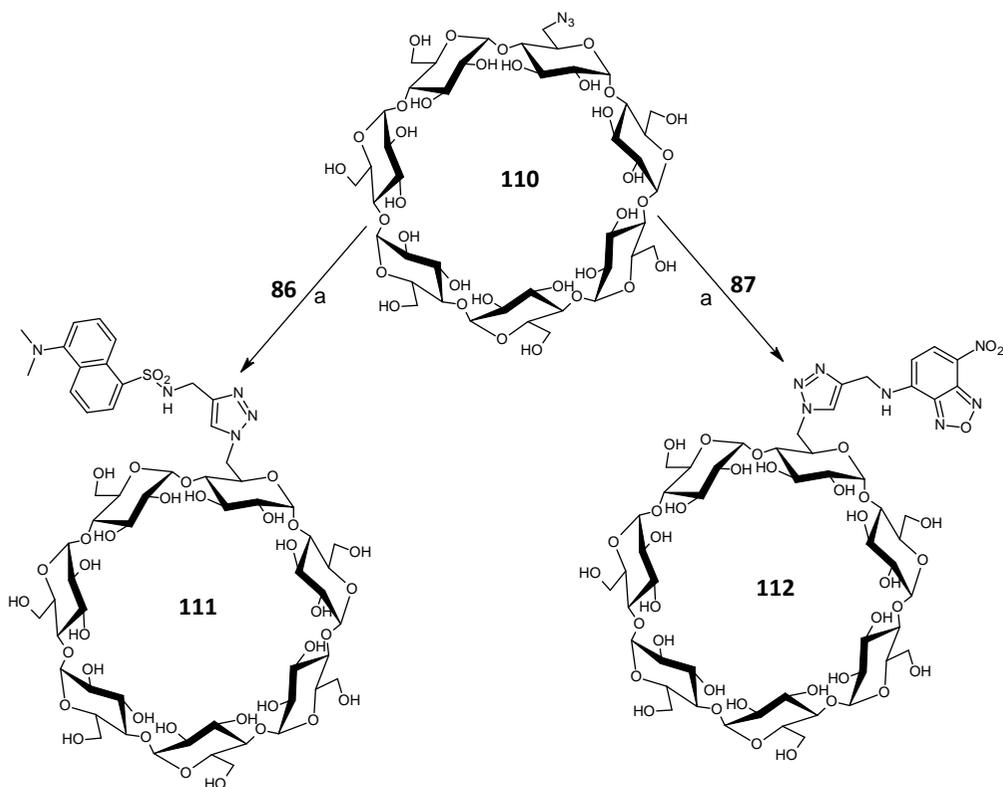
La obtención de los derivados fluorescentes de CD se realizó a partir de la mono-6-azido-6-desoxi- β -ciclodextrina **110**³⁹³ que se hizo reaccionar con los derivados propargilados **86** y **87** en las mismas condiciones que las utilizadas para la síntesis de **95** y **96**, (DMF como disolvente, $(EtO)_3P\cdot CuI$ como catalizador y M.W.). La reacción con **86** utilizando un ligero exceso de este (1.3eq) no terminaba de consumir la CD, a pesar de que por c.c.f. se observaba el exceso de dansilo **86**. Se pensó que, dado que las ciclodextrinas son capaces de ocluir compuestos aromáticos³⁹⁴, el dansilo estaría en el interior de la cavidad de la CD es una disposición que, de alguna manera, impedía que la reacción tuviera lugar. Por ello utilizamos un exceso mayor del compuesto **86**, en concreto 3 eq, lo cual condujo no sólo a que la reacción finalizase sino que además lo hiciera en un corto periodo de tiempo. La purificación del crudo de reacción por cromatografía en columna también resultó problemática. El producto de reacción siempre se aislaba impurificado con algo de **86** a pesar de la gran diferencia de r.f. que existe entre ambos. Para solucionar este problema se pasó en primer lugar una mezcla de

393. Zhang, L. F.; Wong, Y. C.; Chen, L.; Ching, C. B.; Ng, S. C., A facile immobilization approach for perfunctionalised cyclodextrin onto silica via the Staudinger reaction. *Tetrahedron Letters* **1999**, 40, (9), 1815-1818.

394. Corradini, R.; Paganuzzi, C.; Marchelli, R.; Pagliari, S.; Sforza, S.; Dossena, A.; Galaverna, G.; Duchateau, A., Design and synthesis of fluorescent beta-cyclodextrins for the enantioselective sensing of alpha-amino acids. *Chirality* **2003**, 15, S30-S39.

Capítulo 3

tolueno:CH₃CN (1:1) para eliminar el exceso de fluoróforo, ya que el tolueno desplaza al fluoróforo que queda ocluido en la cavidad de la CD. Una vez eliminado el exceso se aumenta la polaridad para sacar el producto deseado. Debido a los buenos resultados obtenidos se empleó esta misma metodología para llevar a cabo la síntesis del derivado de NBD **87**.



Esquema 3.8.: Condiciones: (a) DMF, $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$, M.W.(500W, 80°C, 30 min); **111** 80% y **112** 89%.

3.4.4. Estudios de afinidad de las CDs fluorescentes con la MBP mediante anisotropía de fluorescencia. Empleo de la CD fluorescente **112** en ensayos de competición.

Una vez sintetizados ambos compuestos se llevó a cabo la determinación de la constante de afinidad de la MBP hacia ellos mediante anisotropía de fluorescencia. Al igual que en el caso de la ConA, se prepararon disoluciones con una concentración constante del compuesto fluorescente y con una concentración creciente de proteína, en concreto con **112** se trabajó a 2 μM y con **111** a 5 μM . Las

medidas se llevaron a cabo en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM. Se trabajó a esta fuerza iónica porque estas eran las condiciones en las que el grupo del Prof. Salto nos proporcionaba la proteína, ya que durante la purificación menores concentraciones de sal provocaban la precipitación de la misma. Al no tratarse de una proteína comercial y al disponer de una cantidad limitada de la misma la constante de unión solamente se determinó a 20°C.

En el caso del compuesto **112** apenas se observa variación en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de MBP en el medio, sin embargo no ocurre lo mismo con el compuesto **111**. En este caso, a medida que aumenta la concentración de proteína, se observa un fuerte aumento en la intensidad de fluorescencia, lo cual impide utilizar directamente los datos de anisotropía para establecer la constante de unión, tal y como ocurría en el caso de **91** y **92**. Este hecho se refleja claramente en la **figura 3.14**, en la que se observa que para **112** el ajuste de la ecuación a los valores experimentales es muy bueno mientras que en el caso de **111** no ocurre lo mismo. Para **112** la constante de equilibrio de disociación obtenida fue de **2.8 μM** .

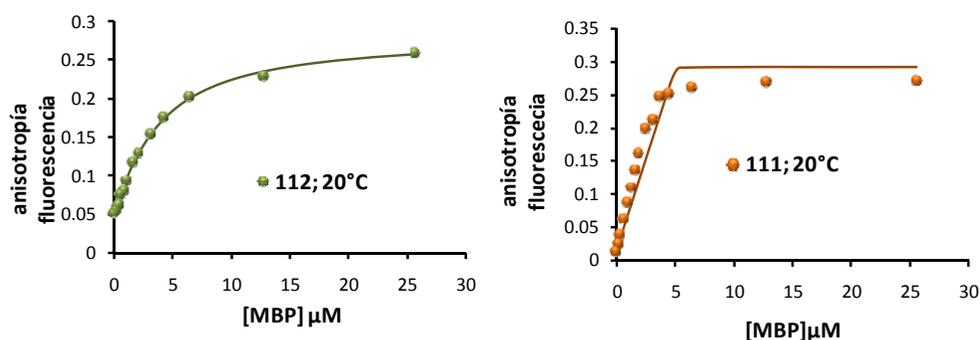


Figura 3.14. Representaciones de los datos de anisotropía (r) de las CDs fluorescentes **111** y **112** en presencia de cantidades crecientes de MBP (0-25 μM) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y su ajuste a la **ecuación 3.10**.

A raíz de los resultados obtenidos, se eligió el compuesto **112** para llevar a cabo los ensayos de competición frente a distintos ligandos de la MBP. En concreto se llevaron a cabo ensayos de competición frente a maltosa y β -CD, para así poder comparar los resultados con los que aparecen en bibliografía para estos

ligandos, y frente al β -propargil maltósido³⁹⁵ y al α -propargil maltósido, para comprobar la especificidad anomérica de esta proteína. Aunque como se mencionó anteriormente es difícil obtener el derivado α del propargil maltósido, conseguimos aislar la cantidad suficiente para llevar a cabo este ensayo de competición.

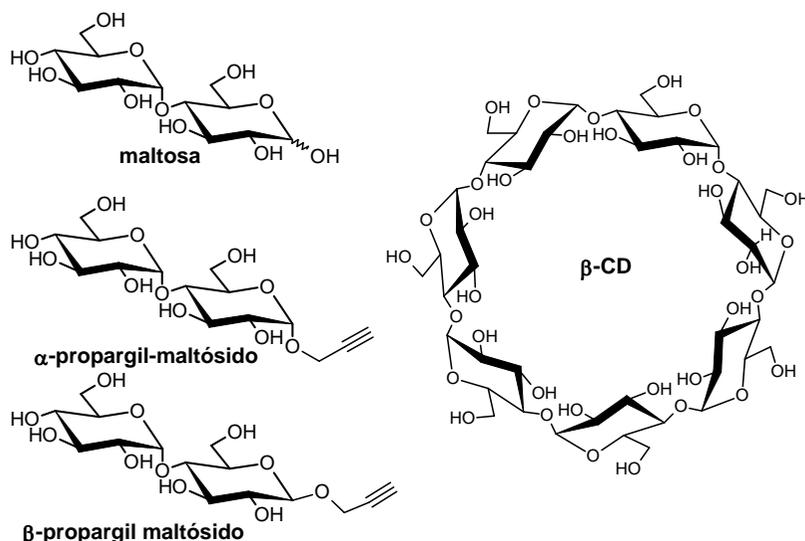


Figura 3.15. Ligandos no fluorescentes utilizados en los ensayos de competición de la MBP.

Al igual que en el caso de la ConA para realizar estos ensayos se prepararon una serie de disoluciones en las que se mantiene constante la concentración de **112** y MBP y se varía la concentración del ligando no fluorescente cuya constante se pretende determinar. Los resultados obtenidos para los distintos ligandos se recogen en la **figura 3.16**.

395. Wagner, R.; Richter, L.; Wersig, R.; Schmaucks, G.; Weiland, B.; Weissmueller, J.; Reiners, J., Silicon-modified carbohydrate surfactants. I. Synthesis of siloxanyl moieties containing straight-chained glycosides and amides. *Appl. Organomet. Chem.* **1996**, 10, (6), 421-435.

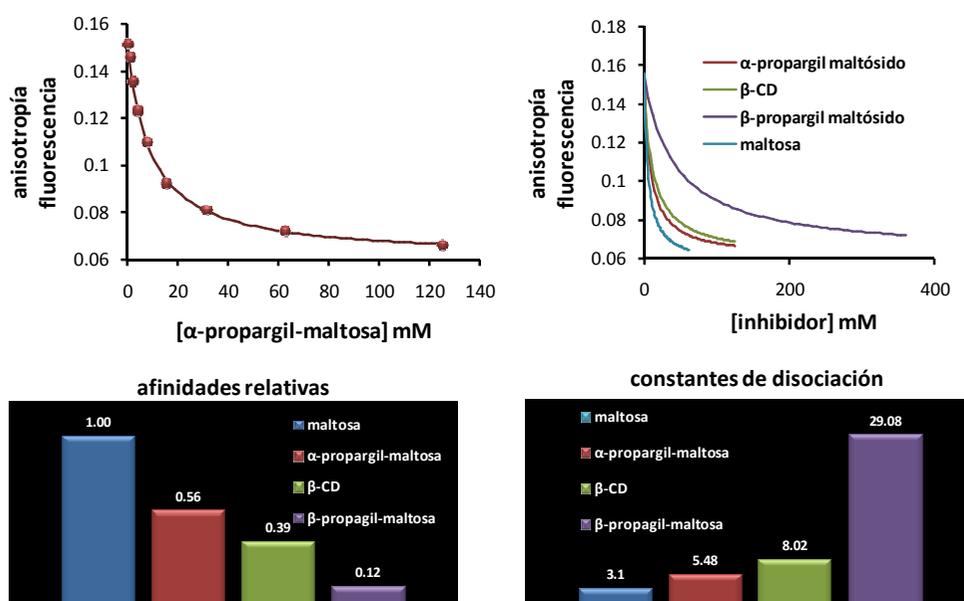


Figura 3.16. Resultados obtenidos para los ensayos de competición por anisotropía de fluorescencia de compuesto 112 frente a β-CD, β-propargil maltósido, α-propargil maltósido y maltosa.

En la **tabla 3.6.** se recogen los valores estimados para las constantes y los IC₅₀ de los ligandos estudiados, así como las constantes hacia la maltosa y la β-CD obtenidas por otras técnicas.

Ligando	K _d (μM)	IC ₅₀ (mM)	K _d (μM)	K _d (μM)	K _d (μM)
	A.F.	A.F.	ITC ³⁹⁶	D.E. ³⁹⁷	Q.F. ³²⁴
maltosa	3.1±0.3	4.9±0.1	1.2	2.2	3.5
α-maltósido	5.5±0.5	8.7±0.1	-	-	-
β-CD	8.0±0.5	12.2±0.3	4.0	-	1.8
β-maltósido	29.1±2.1	41.8±0.8	-	-	-

A.F.: anisotropía de fluorescencia; D.E.: diálisis en equilibrio; Q.F.: quenching de fluorescencia

Tabla 3.6. Valores de IC₅₀ y de las constantes de disociación K_d para la interacción de los ligandos de la **figura 3.15.** con la MBP en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 500 mM, obtenidas a partir de ensayos de competición mediante ajuste de los resultados a las **ecuaciones 3.11.** y **3.12.** y constantes de disociación, para esos mismos ligandos, obtenidas por otras técnicas.

396. Thomson, J.; Liu, Y. F.; Sturtevant, J. M.; Quijcho, F. A., A thermodynamic study of the binding of linear and cyclic oligosaccharides to the maltodextrin-binding protein of Escherichia coli. *Biophysical Chemistry* **1998**, 70, (2), 101-108.

397. Schwartz, M.; Kellermann, O.; Szmelcman, S.; Hazelbauer, G. L., Further-studies on binding of maltose to maltose-binding protein of Escherichia-Coli. *European Journal of Biochemistry* **1976**, 71, (1), 167-170.

Los resultados muestran que el compuesto **112** presenta una mayor afinidad por la MBP que la β -CD sin funcionalizar, de manera que, a diferencia de lo que ocurre en la ConA, en este caso el anillo de NBD parece ejercer un efecto positivo sobre la interacción. Con respecto a la maltosa, el valor de la constante obtenida mediante anisotropía de fluorescencia entra dentro del rango de constantes que aparecen en bibliografía para este ligando. Sin embargo, para la β -CD, aunque su valor entra dentro del orden de las constantes descritas por otros autores, hay una mayor discrepancia, si bien también hay que tener presente que para este último ligando no existe unanimidad en los datos bibliográficos ya que mediante ITC $K_d(\beta\text{-CD}) > K_d(\text{maltosa})$ mientras que mediante Q.F. ocurre lo contrario.

Con respecto a la afinidad anomérica la MBP presenta una afinidad hacia el α -máltosido 5 veces superior que hacia el β . Este resultado es comparable al obtenido por Wemmer y col.³³³ los cuales estudiaron esta especificidad mediante RMN. Según estos autores la MBP se une a la α -maltosa con una afinidad 3 veces superior que a la β -maltosa, y en el caso de maltodextrinas de mayor tamaño el cociente K^α/K^β es incluso mayor (entre 10 y 30).

3.4.5. Síntesis de sistemas fluorescentes conteniendo biotina mediante CuAAC.

Aprovechando esta metodología de síntesis y el hecho de que en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un soporte sólido para la purificación de avidina a partir de su fuente natural la clara de huevo⁸³ se pensó en la posibilidad de obtener derivados de biotina fluorescentes para su empleo en la medida de la actividad de la avidina purificada. De hecho, dada la importancia biotecnológica de la avidina^{398, 399} el establecimiento de su concentración funcional es una medida de rutina.

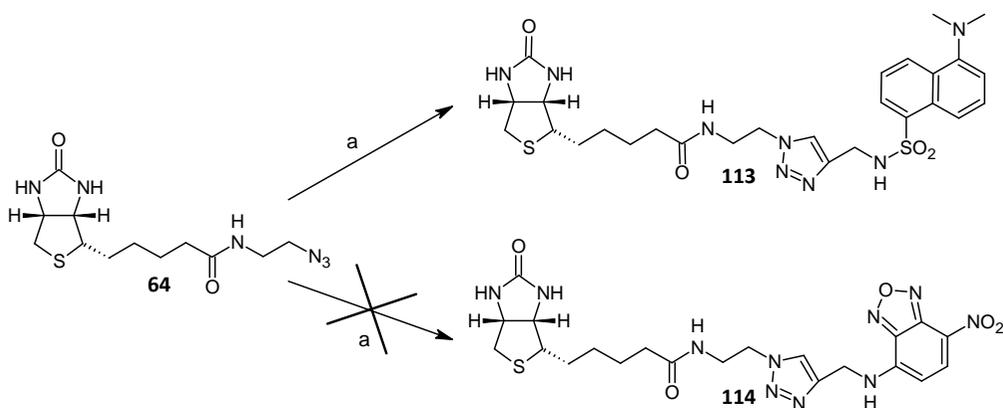
El azido derivado de la biotina del capítulo anterior **64** se hizo reaccionar con los propargil derivados **86** e **87** (esquema 3.9.). Dado que en las reacciones de

398. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Introduction to avidin-biotin technology. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 5-13.

399. Wilchek, M.; Bayer, E. A., Applications of avidin-biotin technology - literature survey. *Methods in Enzymology* **1990**, 184, 14-45.

CuAAC para la síntesis de los agentes de etiquetado doble (biotina-fluoróforo) del **capítulo 1** el empleo de MeOH como disolvente proporcionó muy buenos resultados, se eligió como medio para la reacción. Al igual que en los casos anteriores la reacción se llevó a cabo con M.W. y utilizando $(Et_3O)_3P-CuI$ como catalizador.

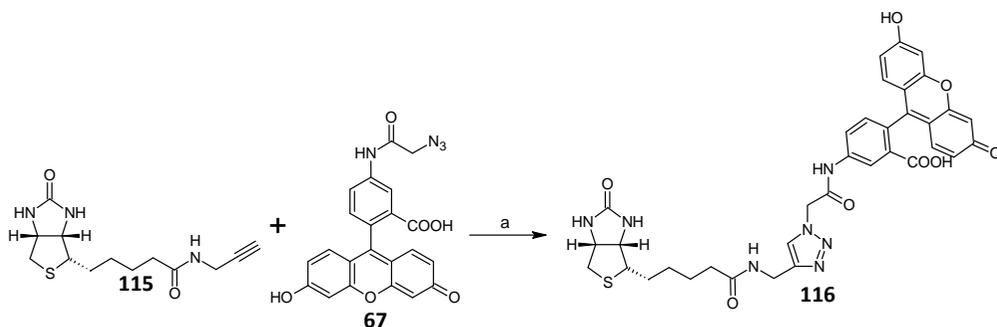
En la reacción con el derivado del dansilo **86** se obtuvo el derivado fluorescente de biotina **113** con excelentes rendimientos, sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción con **87** no se obtuvo el producto deseado.



Esquema 3.9.: Condiciones: (a) MeOH, $(Et_3O)_3P-CuI$, M.W. (500W, 65°C, 40min); **114** 93%.

Para poder obtener el sistema biotina-fluoresceína, al disponer únicamente del azido derivado de la fluoresceína hubo que sintetizar el propargil derivado de la biotina⁴⁰⁰. Al igual que para el azido derivado **64** se generó el cloruro de ácido a partir de biotina por tratamiento con $SOCl_2$, el cual se hizo reaccionar con propargilamina en condiciones anhidras. Utilizando las mismas condiciones que en el caso anterior (MeOH, $(Et_3O)_3P-CuI$ como catalizador y M.W.) se obtuvo la biotina fluorescente **116** con muy buen rendimiento.

400. Bonnet, D.; Ilien, B.; Galzi, J. L.; Riche, S.; Antheaune, C.; Hibert, M., A rapid and versatile method to label receptor ligands using "click" chemistry: Validation with the muscarinic M1 antagonist pirenzepine. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, (6), 1618-1623.



Esquema 3.10.: Condiciones: (a) MeOH, (EtO)₃P-CuI, M.W.(500W, 80°C, 40min), 87%.

3.4.6. Aplicación de los compuestos biotina-fluoróforo en el establecimiento de la concentración efectiva de avidina mediante fluorescencia.

Hasta la fecha existen diversos trabajos de los grupos de Gruber⁴⁰¹⁻⁴⁰⁵ y Papadopoulos^{406,407} en los que a través del empleo de un derivado de biotina fluorescente determinan la actividad de la avidina, o lo que es lo mismo, su concentración efectiva, a partir de la variación que sufre la intensidad de fluorescencia de estos compuestos al unirse a avidina. De los diferentes compuestos utilizados en estos artículos uno era comercial y otros dos han sido

401. Marek, M.; Kaiser, K.; Gruber, H. J., Biotin-pyrene conjugates with poly(ethylene glycol) spacers are convenient fluorescent probes for avidin and streptavidin. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (4), 560-566.

402. Gruber, H. J.; Kada, G.; Marek, M.; Kaiser, K., Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1998**, 1381, (2), 203-212.

403. Gruber, H. J.; Marek, M.; Schindler, H.; Kaiser, K., Biotin-fluorophore conjugates with poly(ethylene glycol) spacers retain intense fluorescence after binding to avidin and streptavidin. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (4), 552-559.

404. Kada, G.; Falk, H.; Gruber, H. J., Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1999**, 1427, (1), 33-43.

405. Kada, G.; Kaiser, K.; Falk, H.; Gruber, H. J., Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1999**, 1427, (1), 44-48.

406. Agiamarnioti, K.; Triantis, T.; Dimotikali, D.; Papadopoulos, K., Synthesis and fluorescent properties of novel biotinylated labels - Prospects for application in bioanalytical detections. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2005**, 172, (3), 215-221.

407. Agiamarnioti, K.; Triantis, T.; Papadopoulos, K.; Scorilas, A., 10-(2-Biotinyloxyethyl)-9-acridone - A novel fluorescent label for (strept)avidin-biotin based assays. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2006**, 181, (1), 126-131.

comercializados con posterioridad. Sin embargo, nos encontramos con pocos ejemplos en los que se haga uso de la anisotropía de fluorescencia^{403,405,408} como⁹⁷ parámetro para este mismo fin, y además los resultados que proporciona se utilizan para obtener información semicuantitativa, lo cual nos animó a explorar su potencial.

Para poner de manifiesto la aplicabilidad de esta técnica y de los compuestos sintetizados para este fin se prepararon disoluciones de los sistemas fluorescentes **113** y **116** en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM y se les adicionaron cantidades crecientes de una disolución de avidina de concentración y actividad conocidas. En concreto se utilizaron dos concentraciones para **113** (0.7 y 0.35 μM) y otras dos para **116** (0.4 y 0.2 μM) y se trabajó a 20°C. Tal y como se observa en la **figura 3.17**. en todos los casos se produce un aumento en la señal de anisotropía de fluorescencia, como cabía esperar, hasta alcanzar un plató. En el caso del compuesto **113** los puntos de la valoración pueden ajustarse a dos rectas cuya intersección, que puede considerarse como el punto de equivalencia, se corresponde, prácticamente, con una estequiometría 1:4 avidina:biotina que es la que presenta esta proteína. En el caso del compuesto **116** los puntos que se encuentran justo antes del punto de equivalencia no pueden ser ajustados a una línea recta. Esta desviación de la linealidad se produce como consecuencia del acusado *quenching* que sufre este compuesto al unirse a la avidina. A pesar de ello, es posible ajustar estos puntos a otro tipo de ecuación, polinómica o exponencial, para así poder establecer el punto de equivalencia. Al igual que en el caso del compuesto **113** esta intersección queda muy próxima a la estequiometría 1:4 de la avidina. Otra característica a destacar de ambos compuestos es que equilibrio se alcanza rápidamente y no es necesario incubar la muestra tras la adición de avidina para llevar a cabo la medida de la señal, como ocurre en otros casos⁴⁰⁴. Además de alcanzarse el equilibrio inmediatamente, éste permanece estable durante bastante tiempo, ya que se ha comprobado que al menos durante 24 horas la señal alcanzada permanece invariable.

408. Schray, K. J.; Artz, P. G.; Hevey, R. C., Determination of avidin and biotin by fluorescence polarization. *Analytical Chemistry* **1988**, 60, (9), 853-855.

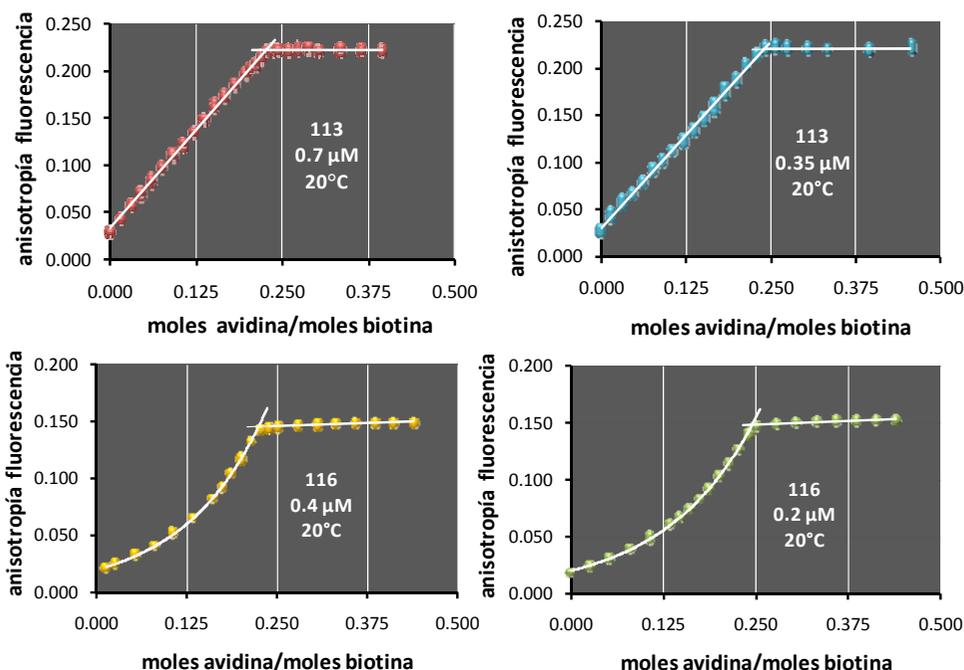


Figura 3.17. Representaciones de los datos de anisotropía (r) de los derivados fluorescentes de biotina **113** y **116**, a dos concentraciones diferentes y 20°C, en presencia de cantidades crecientes de avidina (0-0.450 moles avidina/moles biotina) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y su ajuste lineal o polinómico, según el caso, por mínimos cuadrados.

Para aprovechar el *quenching* que sufre el compuesto **116** (que está en torno al 60%) se llevó a cabo la misma valoración utilizando como parámetro la intensidad de fluorescencia del mismo. Como se observa en la **figura 3.18.** a medida que aumenta la cantidad de avidina en solución disminuye la intensidad de fluorescencia hasta alcanzar un plató. En este caso sí que es posible ajustar los datos experimentales a dos rectas cuya intersección, al igual que en los casos anteriores, queda muy próxima a la estequiometría 1:4 propia de la avidina.

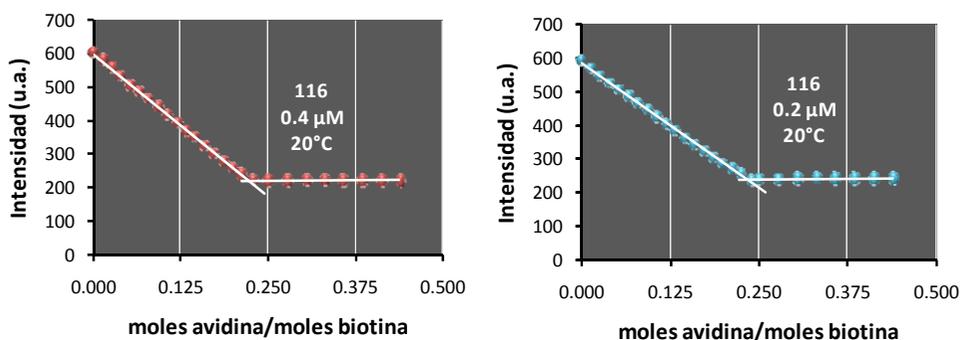


Figura 3.18. Representaciones de los datos de intensidad de fluorescencia del derivado de biotina **116**, a dos concentraciones diferentes, en presencia de cantidades crecientes de avidina (0-0.450 moles avidina/moles biotina) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y su ajuste lineal por mínimos cuadrados

Los excelentes resultados obtenidos a 20°C nos animaron a estudiar la influencia de la temperatura sobre el resultado de la valoración. En la **figura 3.19**, se recogen estos nuevos ensayos que se realizaron a 10°C.

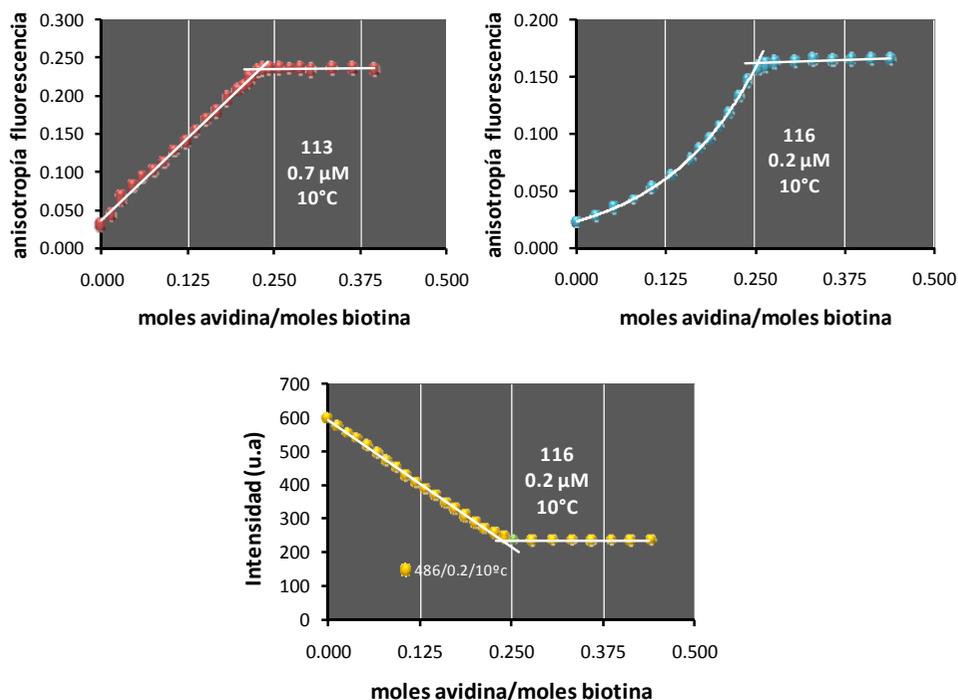


Figura 3.19. Representaciones de los parámetros de fluorescencia de los derivados de biotina **113** y **116**, a 10°C, en presencia de cantidades crecientes de avidina (0-0.450 moles avidina/moles biotina) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 y su ajuste lineal o polinómico, según el caso, por mínimos cuadrados.

Como era de esperar, el punto de equivalencia no se ve afectado por la temperatura. Sin embargo, lo que sí se modifica son los valores de los parámetros utilizados, es decir la intensidad de fluorescencia y la anisotropía de fluorescencia.

Los resultados obtenidos en las diferentes condiciones con ambos compuestos se resumen en las tablas 3.7. y 3.8.:

	113-0.7μM-20$^{\circ}$C	113-0.7μM-10$^{\circ}$C	113-0.35μM-20$^{\circ}$C
Actividad avidina	16.2	16.1	15.3
moles avidina/moles biotina	0.227	0.230	0.240
Estequiometría Avidina:biotina	1:4.4	1:4.35	1:4.17

Tabla 3.7. Resultados obtenidos a partir del derivado fluorescente de biotina **113** en las diferentes condiciones ensayadas. Actividad avidina: μ g biotina/mg avidina.

	0.4μM	0.4μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM
	20$^{\circ}$C	20$^{\circ}$C	20$^{\circ}$C	20$^{\circ}$C	10$^{\circ}$C	10$^{\circ}$C
	anis	intens	anis	intens	anis	intens
Actividad avidina	16.0	16.5	15.2	15.8	14.5	15.5
moles avidina/moles biotina	0.231	0.224	0.244	0.234	0.255	0.239
Avidina:biotina	1:4.33	1:4.46	1:4.1	1:4.27	1:3.92	1:4.18

Tabla 3.8. Resultados obtenidos a partir del derivado fluorescente de biotina **116** en las diferentes condiciones ensayadas. Actividad avidina: μ g biotina/mg avidina.

Los resultados obtenidos para la actividad de la avidina concuerdan bastante bien con el valor de 15 μ g biotina/mg avidina que proporciona Sigma-Aldrich para el lote utilizado. Las desviaciones que se observan están dentro de los errores experimentales de pipeteo (se llevan a cabo adiciones de 10 μ L) y preparación de la disolución del compuesto fluorescente. Sin embargo estas desviaciones no suponen ningún inconveniente para su posible utilización en la medida de la actividad de una muestra real ya que en estos casos lo que se suele hacer es estandarizar o valorar la disolución del compuesto fluorescente a partir de

una disolución de avidina de concentración conocida la cual, a su vez, ha sido valorada previamente con biotina⁴⁰⁹.

En el caso del compuesto **116**, debido al elevado rendimiento cuántico que presenta la fluoresceína, es posible trabajar a concentraciones mucho más bajas, lo que nos permite, por tanto, valorar disoluciones de avidina más diluidas. Para ver como se comportaba el sistema a mayor dilución se preparó una disolución de **116** con una concentración de 40nM y al igual que en los casos anteriores se fueron adicionando cantidades crecientes de una disolución de avidina de concentración conocida (se llevó a cabo una dilución 1/5 de la disolución de avidina utilizada en los casos anteriores). El resultado en este caso aparece en la siguiente **figura 3.20.**

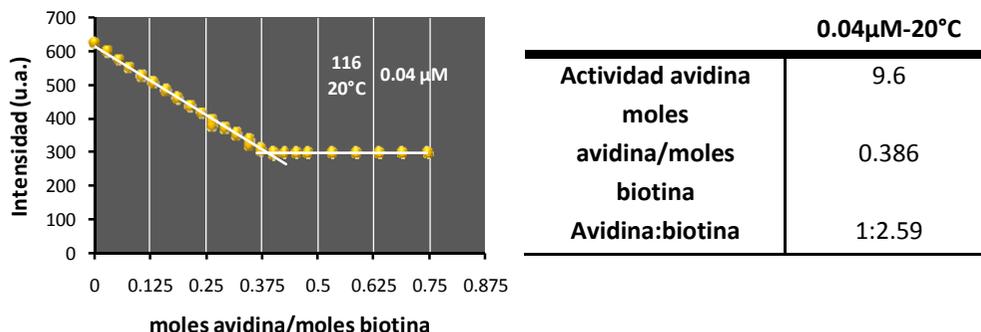


Figura 3.20. Representación de los datos de anisotropía (r) del derivado fluorescente de biotina **116**, a 0.04 μM, en presencia de cantidades crecientes de avidina (0-0.750moles avidina/moles biotina) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, su ajuste lineal por mínimos cuadrados y los resultados obtenidos a partir de la misma.

Como se observa, tanto en la gráfica como en la tabla, la actividad de la avidina está por debajo de la que proporciona Sigma-Aldrich y la obtenida a concentraciones mayores. Cabría pensar que ésto es debido a que el tiempo de incubación en este caso fue insuficiente, sin embargo no se observó ningún cambio en la señal. en muestras que se midieron inmediatamente y tras 24 de incubación. Esta disminución de la actividad de avidina ha sido observada con anterioridad por otros autores. Según Hevey⁴⁰⁸, cuando se trabaja a muy bajas concentraciones de avidina se produce una perdida de actividad de la misma como consecuencia de su

⁴⁰⁹. Lin, H. J.; Kirsch, J. F., Sensitive fluorometric assay for avidin and biotin. *Analytical Biochemistry* **1977**, 81, (2), 442-446.

adsorción sobre el vidrio. De hecho, algunos autores⁴⁰⁵ llevan a cabo este tipo de ensayos en presencia de BSA para evitar estos procesos de adsorción y pérdida de actividad. Para comprobar que este resultado se debía a la avidina y no a nuestro compuesto se valoró una disolución de avidina, con una concentración del mismo orden que la utilizada en este último experimento, con dos concentraciones diferentes de biotina y utilizando el método desarrollado por Kirsch y col.⁴⁰⁹. Los valores de actividad que se obtuvieron utilizando esta metodología fueron de 9.5 y 9.8 que están de acuerdo con el resultado que proporciona el compuesto **116**. De manera que podemos concluir que estos compuestos nos permiten determinar la **concentración efectiva** de una disolución de avidina.

La anisotropía, al tratarse de un cociente de intensidades, no depende ni de la concentración de compuesto fluorescente ni de la intensidad de luz que emitida⁴¹⁰, aunque esta señal sí se ve afectada por la temperatura. La representación de los datos de anisotropía para ambos compuestos a 20°C y a las diferentes concentraciones a las que hemos trabajado frente a la proporción avidina/ biotina en solución (**figura 3.21.**) revela que, independientemente de la concentración de biotina fluorescente utilizada las representaciones son prácticamente superponibles, es decir el valor de anisotropía que se registra no depende tanto de la concentración de biotina fluorescente como de la proporción avidina/biotina. En principio sería posible determinar la actividad o concentración efectiva de una muestra real mediante la medida de un solo punto⁴⁰⁵ y su interpolación en estas representaciones, siempre y cuando el valor obtenido no caiga dentro del plató y se conozca la concentración de ligando.

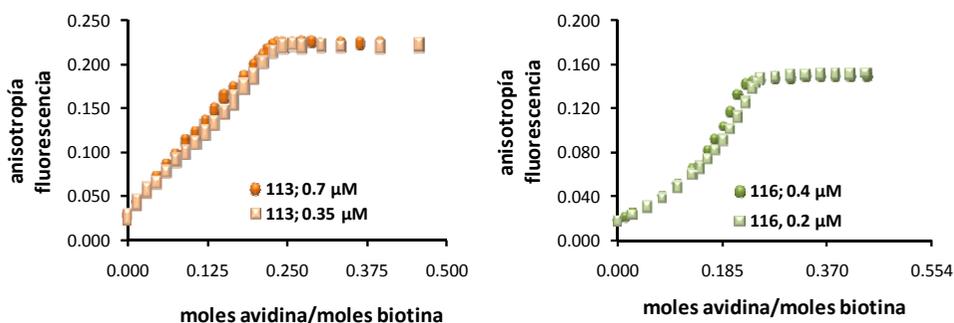


Figura 3.21. Superposición de los datos de anisotropía (r) de los derivados fluorescentes de biotina **113** y **116**, a dos concentraciones diferentes y 20°C, en presencia de cantidades crecientes de avidina (0-0.450 moles avidina/moles biotina) en tampón fosfato 50 mM pH 7.5.

⁴¹⁰. Seethala, R., Fluorescence polarization competition immunoassay for tyrosine kinases. *Methods* **2000**, 22, (1), 61-70.

3.5. Conclusiones.

Se ha demostrado la eficiencia de las reacciones de CuAAC para la síntesis de ligandos fluorescentes de distinta naturaleza y la aplicación de éstos a estudios de afinidad con sus correspondientes receptores a través de medidas de anisotropía de fluorescencia.

Los gliconjugados fluorescentes **91**, **92**, **95**, **96** y **97** que contienen α -D-manosa interaccionan con la lectina ConA. Mediante el empleo del glicoconjugado **97** y a través de ensayos de competición es posible establecer las afinidades relativas de ligandos no fluorescentes que no sean multivalentes o cuya afinidad no sea muy elevada. Para el caso del metil α -D-manopiranosido las constantes obtenidas mediante esta técnica son comparables a las que aparecen en bibliografía determinadas mediante calorimetría.

Mediante anisotropía de fluorescencia se ha demostrado que los derivados fluorescentes de β -CD **111** y **112** son capaces de interaccionar con la MBP y en el caso de **112** se ha establecido su constante de disociación. Así mismo se ha validado el empleo de **112** para la determinación de constantes de disociación para otros ligandos no fluorescentes de la MBP mediante ensayos de competición, obteniéndose valores comparables a los que proporcionan otras técnicas bien consolidadas, como es el caso de la calorimetría.

Los ensayos de anisotropía de fluorescencia presentan una serie de ventajas importantes frente a otros métodos empleados para el análisis de interacciones receptor-ligando. Los ensayos tipo ELISA son tediosos y requieren conjugados receptor-enzima que no siempre se encuentran disponibles comercialmente y los ensayos de ITC y SRP son demasiado complicados y poco accesibles para ser usados como ensayos de rutina. Sin embargo, la medida de este tipo de interacciones mediante anisotropía de fluorescencia es sencilla, se lleva a cabo en condiciones de equilibrio real y además pueden utilizarse placas ELISA para realizar las medidas, lo que acelera el proceso.

En el caso de los compuestos fluorescentes que contienen biotina se ha demostrado:

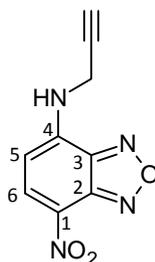
Capítulo 3

1. Ambos compuestos presentan alta afinidad, rápida asociación y una unión no cooperativa a la avidina⁴⁰⁴ y, además, los resultados obtenidos para la actividad de avidina son comparables entre sí y al valor que proporciona Sigma-Aldrich
2. El compuesto **116** presenta una serie de ventajas sobre el **113**:
 - ✓ Es posible trabajar con dos propiedades diferentes, anisotropía e intensidad de fluorescencia, ya que ambas proporcionan resultados similares.
 - ✓ Debido a su mayor rendimiento cuántico es posible utilizar concentraciones muchos mas pequeñas, lo cual nos permite analizar disoluciones de avidina más diluidas.
 - ✓ Aunque gráficamente no se observe, el compuesto **116** proporciona señales mucho más estables y que fluctúan menos que las del compuesto **113**.

3.6. Sección experimental.

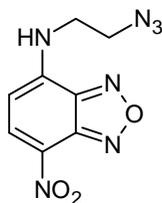
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 87 y 88.

A una disolución de cloruro de NBD comercial (250 mg, 1.25 mmol) en MeOH (15 mL) se le añadió propargilamina o 2-azidoetilamina (7.5 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 3 horas en el caso de la propargilamina y 2 horas para la 2-azidoetilamina. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía en columna (Cl_2CH_2).



Se obtuvo **361** como un sólido (209 mg, 76%).

P.f.: 156-158 °C; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3271, 3068, 2115, 1616, 1576, 1489, 1448, 1289, 1230, 1181, 1120, 1014; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300MHz): δ 8.55 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.37 (sa, 1H, NH), 6.36 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-5), 4.31 (dd, 2H, $J=5.8$ y 2.5 Hz, CH_2), 2.44 (t, 1H, $J=2.5$ Hz, CH); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 144.3, 143.8, 142.3, 135.9, 100.1, 77.1, 74.2, 33.5; **EM-AR:** (FAB+): calc. para $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$: 241.0337; enc.: 241.0332.



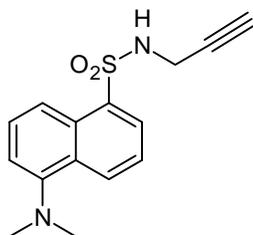
Se obtuvo **363** como un sólido (250 mg, 80%)

Capítulo 3

P.f.: 146-148 °C; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3242, 3067, 2117, 1618, 1582, 1483, 1444, 1315, 1245, 1132; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.47 (s, 1H, NH), 8.51 (d, 1H, $J=9$ Hz, H-6), 6.50 (d, 1H, $J=9$ Hz, H-5), 3.68 (sa, 4H, $2 \times \text{CH}_2$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO- d_6 , 75MHz): δ 144.9, 144.2, 144.0, 137.6, 121.2, 99.4, 48.8, 42.7; **EM-AR:** (FAB+): calc. para: $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_7\text{O}_3\text{Na}$: 272.0508; enc.: 272.0509.

Síntesis del compuesto 86³⁸⁴.

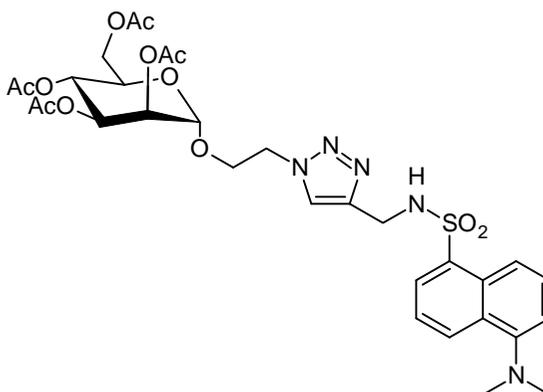
A una disolución de cloruro de dansilo comercial (810 mg, 3mmol) en Cl_2CH_2 (20 mL) se le añadió propargilamina (420 μL , 6 mmol) y Et_3N (640 μL , 4.5 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (Cl_2CH_2) obteniéndose **86** como un sólido (828mg, 96%).



P.f.: 96-98 (lit. 93-95°C); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3349, 3259, 1572, 1405, 1318, 1141, 1065; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300MHz): δ 8.55 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, H-2dan), 8.27 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, H-4,8dan), 7.56 (t, 1H, $J=8$ Hz) y 7.51 (t, 1H, $J=7.8$ Hz) [H-3,7dan], 7.18 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 5.10 (t, 1H, $J=6$ Hz, NH), 3.77 (dd, 2H, $J=6$ y 2.5 Hz, CH_2), 2.88 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.91 (t, 1H, $J=2.5$ Hz, $\equiv\text{CH}$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 152.1, 134.3, 130.0, 129.9, 130.9, 130.0, 128.7, 123.3, 118.7, 115.3, 77.9, 72.8, 45.5, 33.1; **EM-AR:** (FAB+) calc. para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNa}$: 311.0830; enc.: 311,0838.

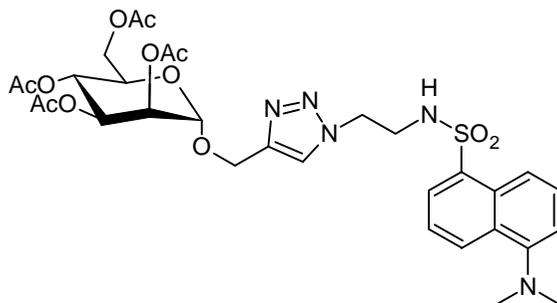
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 89 y 90.

A una disolución de **86** (160 mg, 0.55 mmol) y α -azidoetil manósido **84** (301 mg, 0.72 mmol) o de **63** (177 mg, 0.55 mmol) y α -propargil manósido **85** (278 mg, 0.72 mmol) en tolueno anhidro (15 mL) se le añadió $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (30 mg, 0.083 mmol). La mezcla de reacción se irradió con M.W. (500W, 100°C, 50min). El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 5:1).



Se obtuvo **89** como un sólido (372mg, 95%).

P.f.: >80°C reblandece; $[\alpha]_D +14.6^\circ$ (c 1, Cl_3CH); **IR** (KBr, cm^{-1}): 1745, 1367, 1224, 1138, 1044; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300MHz): δ 8.47(d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-2dan), 8.28 (d,1H, $J=8.6$ Hz, H-8dan), 8.22 (d, 1H, $J=6.6$ Hz, H-4dan), 7.45 (t, 2H, $J=8$ Hz, H-3,7dan) 7.42 (s, 1H, H-triazol), 7.13 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 6.26 (t, 1H, $J=6.2$ Hz, NH), 5.24-5.10 (m, 2H, H-3,4man), 5.07 (sa, 1H, H-2man), 4.66 (d, 1H, $J=1.3$ Hz, H-1man), 4.38 (t, 2H, $J=5$ Hz, CH_2N), 4.17 (d, 2H, $J=6.2$ Hz, CH_2NH), 4.10 (dd, 1H, $J=12.3$ y 5.2 Hz, H-6man), 4.00 (dd, 1H, $J=12.3$ y 2,4 Hz, H-6'man), 3.96 (m, 1H) y 3.72 (m, 1H) [CH_2O], 3.45 (m, 1H, H-5man), 2.82 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.07, 2.01, 1.98, 1.94 (4s, 12H, $4\times\text{CH}_3\text{COO}$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 170.5, 170.2, 170.0, 169.6 ($4\times\text{CO}$), 151.7 (C-5dan), 144.1 (C), 134.6, 129.6, 129.4 (C-1,9,10 dan), 130.2 (C-2dan), 129.5 (C-8dan), 128.1, 123.1 (C-3,7dan), 123(CH), 118.7 (C-4dan), 115.0 (C-6dan), 97.1 (C-1man), 69.1, 68.8, 68.7 (C-2,3,5man), 65.9 (CH_2O), 65.5 (C-4man), 62.1 (C-6man), 49.5 (CH_2N), 45.2 ($2\times\text{CH}_3$), 38.6 (CH_2NH), 20.7, 20.6, 20,5, 20,4 ($4\times\text{CH}_3\text{COO}$); **EM-AR:** (FAB+): cal. para $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{SNa}$: 728.2212; enc.: 728,2210.

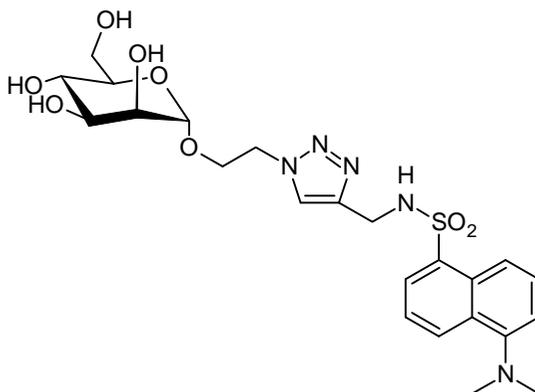


Se obtuvo **90** como un sólido (387mg, 99%).

P.f.: >76°C reblandece; $[\alpha]_D +41.8^\circ$ (c 1, Cl_3CH); **IR** (KBr, cm^{-1}): 1752, 1571, 1454, 1368, 1228, 1138, 1044; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 300MHz): δ 8.57(d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-2dan), 8.27 (d,1H, $J=7.3$ Hz, H-4dan), 8.21 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-8dan), 7.58-7.52 (m, 2H, H-3,7dan), 7.52 (s, 1H, H-triazol), 7.20 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 5.69 (t, 1H, $J=6.3$ Hz, NH), 5.38-5.27 (m, 2H, H-3,4man), 5.16 (m, 1H, H-2man), 4.94 (d, 1H, $J=1.6$ Hz, H-1man), 4.79 (d, 1H, $J=12.5$ Hz) y 4,67 (d, 1H, $J=12.5$ Hz) [CH_2O], 4.42 (t, 2H, $J=5.4$ Hz, CH_2N), 4.26 (dd, 1H, $J=12.3$ y 5.2 Hz, H-6man), 4.16-4.06 (m, 2H, H-5,6' man), 3.44 (dt, 2H, $J=5.4$ y 6.3 Hz, CH_2NH), 2.89 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.15, 2.11, 2.04, 1.99 (4s, 12H, $4\times\text{CH}_3\text{COO}$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): δ 170.9, 170.4, 170.0, 169.8 ($4\times\text{CO}$), 143.6, 134.7, 130.9, 129.7, 129.6, 128.7, 124.5, 123.4, 115.7, 96.8(C-1man), 69.9, 69.0, 68.8 (C-2,3,5man), 66.2 (C-4man), 62.5 (C-6man), 61.2 (CH_2O), 50.5 (CH_2N), 45.6 ($2\times\text{CH}_3$), 42.9 (CH_2NH), 21.0, 20.9, 20,8($4\times\text{CH}_3\text{COO}$); **EM-AR:** (FAB+): cal. para $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{12}\text{SNa}$: 728.2212; enc.: 728,2211.

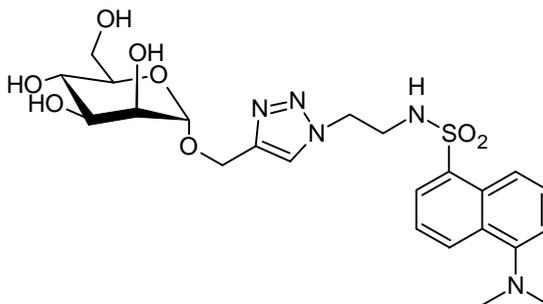
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 91 y 92.

A una disolución de **89** y **90** (298 mg, 0.42 mmol) en MeOH (10 mL) se le añadió Et₃N (0.7 mL, 5.1 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación magnética a 50°C durante una noche. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1).



Se obtuvo **91** como un sirope (206mg, 91%).

$[\alpha]_D +21.7^\circ$ (c 1, MeOH); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3382, 1569, 1453, 1354, 1172, 1120, 1056; **¹H-RMN** (MeOD- d_4 , 300MHz): δ 8.53 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-2dan), 8.36 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-8dan), 8.22 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, H-4dan), 7.60 (m, 2H, H-3,7dan), 7.50 (s, 1H, H-triazol), 7.34 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 4.69 (s, 1H, H-1man), 4.39 (m, 2H, CH₂N), 4.16 (s, 2H, CH₂NH), 3.96 (m, 1H), 3.80-3.56 (m, 6H), 3.08 (m, 1H), 2.92 (s, 6H, 2xCH₃); **¹³C-RMN** (MeOD- d_4 , 75MHz): δ 152.0, 145.4, 136.9, 130.8, 130.7, 130.5, 129.2, 125.1, 124.7, 121.1, 116.8, 101.4, 74.7, 72.4, 71.8, 68.3, 66.4, 62.7, 51.0, 46.0, 38.9; **EM-AR**: (FAB+): calc. para: C₂₃H₃₁N₅O₈SNa: 560.1791; enc: 560.1789.

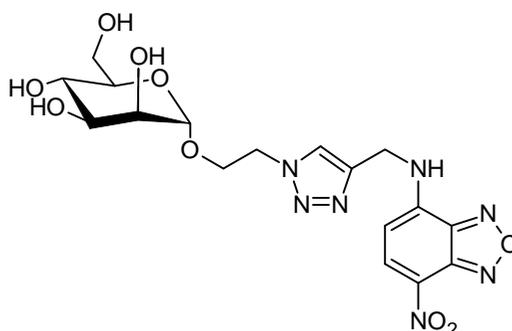


Se obtuvo **92** como un sólido (205 mg, 90%).

P.f.: >120°C reblandece; $[\alpha]_D +32.7$ (c1, H₂O); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3383, 1572, 1455, 1321, 1228, 1057, cm⁻¹; **¹H-RMN** (MeOD-d₄, 400MHz): δ 8.58 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-2dan), 8.23 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-8dan), 8.19 (d, 1H, $J=7.2$ Hz, H-4dan), 7.69 (s, 1H, H-triazol), 7.59 (t, 1H, $J=7.2$ Hz) y 7.55(t, 1H, $J=8.4$ Hz)[H-3,7dan], 7.28 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 4.81 (d, 1H, $J=1.4$ Hz, H-1man), 4.65 (d, 1H, $J=12.4$ Hz) y 4.50 (d,1H, $J=12.4$ Hz) [CH₂Oman], 4.40 (t, 2H, $J=5.8$ Hz, CH₂N), 3.87 (dd, 1H, $J=11.8$ y 2.0 Hz, H-6man), 3.77 (dd, 1H, $J=3.0$ y 1.7 Hz, H-2man), 3.72 (dd, 1H, $J=11.8$ y 5.2 Hz, H-6'man), 3.60 (t, 1H, $J=9.2$ Hz, H-4man), 3.66 (dd, 1H, $J=9.0$ y 3.2 Hz, H-3man), 3.54 (ddd, 1H, $J=9.2$, 6.0 y 2.1 Hz, H-5man), 3.37 (t, 2H, $J=5.7$ Hz, CH₂NH), 2,90 (s, 6H, 2xCH₃); **¹³C-RMN** (MeOD-d₄, 100MHz): δ 153.3, 145.0, 136.6, 131.5, 131.3, 130.8, 130.2, 129.2, 125.8, 124.3, 120.4, 116.5, 100.8, 74.9, 72.5, 72.0, 68.6, 63.0, 60.6, 51.1, 45.8, 43.6; **EM-AR:** (FAB+): calc. para: C₂₃H₃₁N₅O₈SNa: 560.1791; enc: 560.1793

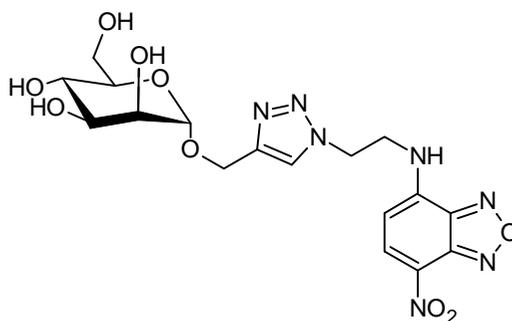
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 95 y 96

A una disolución de **87** (110 mg, 0.5 mmol) y α -azidoetil manósido **93** (163 mg, 0.66 mmol) o de **88** (125 mg, 0.5 mmol) y α -propargil manósido **94** (142 mg, 0.66 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se le añadió (EtO)₃P·CuI (27 mg, 0.076 mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500W, 80°C, 30min). El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna.



Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) se obtuvo **95** como un sólido (230 mg, 98%).

P.f.: >120°C reblandece; $[\alpha]_D +33.7$ (c 1, H₂O); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3367, 1620, 1590, 1492, 1294, 1231, 1128, 1093, 1056, 1019.; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300MHz): δ 9.81 (sa, 1H, NH), 8.52 (d, 1H, *J*=8.8 Hz, H-6NBD), 8.07 (s, 1H, H-triazol), 6.50 (d, 1H, *J*=8.9 Hz, H-5NBD), 4.73-4.60 (m, 4H), 4.57 (d, 1H, *J*=1.0 Hz, H-1man), 4.58-4.43 (m, 3H), 4.39 (t, 1H, *J*=5.9 Hz), 3.90 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.37(m, 1H), 3.32 (m, 2H), 3.03 (m, 1H); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 125MHz): δ 144.8, 144.4, 142.9, 138.4, 124.2, 100.0, 74.1, 70.9, 70.2, 66.9, 65.2, 61.3, 49.9.; **EM-AR:** (FAB+) calc. para C₁₇H₂₁N₇O₉Na: 490.1298; enc.: 490.1293.



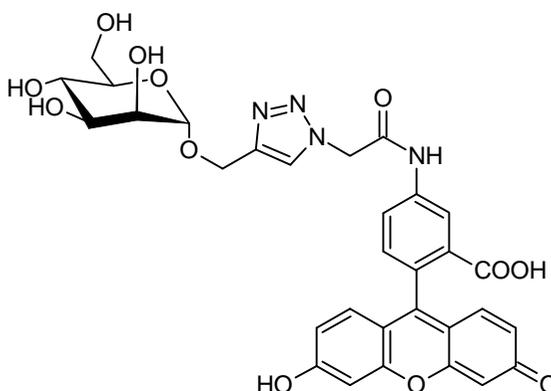
Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1 a AcOEt-MeOH 2:1) se obtuvo **96** como un sólido (218 mg, 93%).

Capítulo 3

P.f.: >68°C reblandece; $[\alpha]_D +44.0^\circ$ (c 1 H₂O); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3368, 2929, 1623, 1589, 1494, 1443, 1403, 1339, 1300, 1256, 1130, 1052; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 400MHz): δ 9.46 (s, 1H, NH), 8.50 (d, 1H, *J*=8.9 Hz, H-6NBD), 8.18 (s, 1H, H-triazol), 6.44 (d, 1H, *J*=8.9 Hz, H-5NBD), 4.74 (t, 2H, *J*=4.6 Hz, CH₂N), 4.70 (s, 1H, H-1man), 4.68 (m, 2H, 2xOH), 4.63 (d, 1H, *J*=12.2 Hz, CH₂Oman), 3.98 (sa, 2H, CH₂NH), 3.67 (dd, 1H, *J*=11.0 y 6.0 Hz, H-6man), 3.54 (sa, 1H, H-2man), 3.50-3.30 (m, 4H, H-3,4,5,6' man); **¹³C-RMN** (DMSO-d₄, 100MHz): δ 144.8, 144.4, 144.1, 143.6, 137.7, 124.7, 121.5, 99.5, 99.0, 74.2, 70.9, 70.2, 67.0, 61.3, 59.1, 47.5, 43.2; **EM-AR:** (FAB+): calc. para C₁₇H₂₁N₇O₉Na: 490.1298; enc.: 490.1294.

Síntesis del compuesto 97.

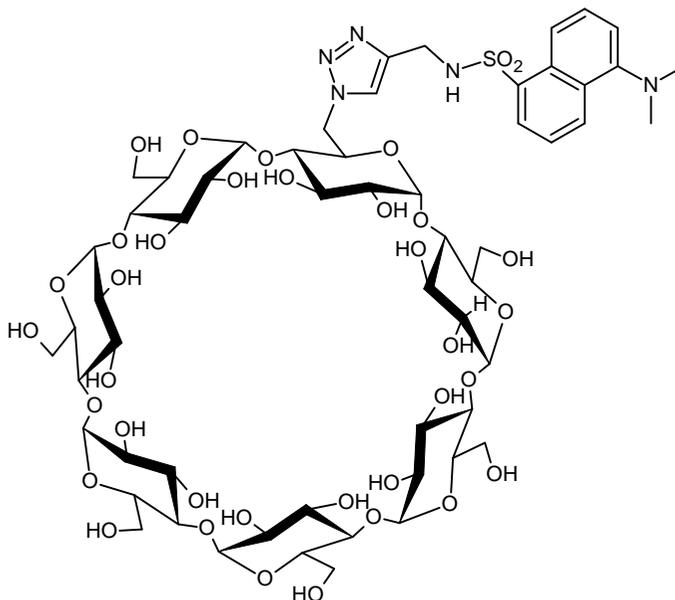
A una disolución de **67** (85 mg, 0.20 mmol) y propargilmanósido **94** (56 mg, 0.26 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se le añadió (EtO)₃P·CuI (11mg, 0.03mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500W, 80°C, 30min). El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 2:1 a AcOEt-MeOH 1:3) obteniéndose **97** como un sólido (100mg, 78%).



$[\alpha]_D +13.6$ (c 0.125, H₂O); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3400, 1695, 1637, 1589, 1465, 1409, 1386, 1306, 1209, 1110, 1056.; **¹H-RMN** (DMSO-d₆ x D₂O, 600MHz): δ 8.11 (varios m, 2H), 7.80 (sa, 1H), 7.05 (d, 1H, *J*=8.2 Hz), 6.68 (m, 2H), 6.28 (m, 4H), 5.34 (sa, 2H, CH₂CO), 4.74 (s, 1H, H-1man), 4.69 (d, 1H, *J*=12.3 Hz) y 4.54 (d, 1H, *J*=12.3 Hz) [CH₂O], 3.69-3.25 (varios m, 6H); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75MHz): δ 169.0, 164.4, 155.9, 143.2, 138.7, 129.9 (CH-triazol), 125.6, 125.6, 120.0, 110.3, 102.4, 98.7 (C-1man), 74.1, 70.8, 70.1, 66.9, 62.9 (C-6man), 61.2 (CH₂O), 58.8 (CH₂CO).; **EM-AR:** (FAB+) calc. para C₃₁H₂₈N₄O₁₂Na: 671.1601; enc.: 671.1602.

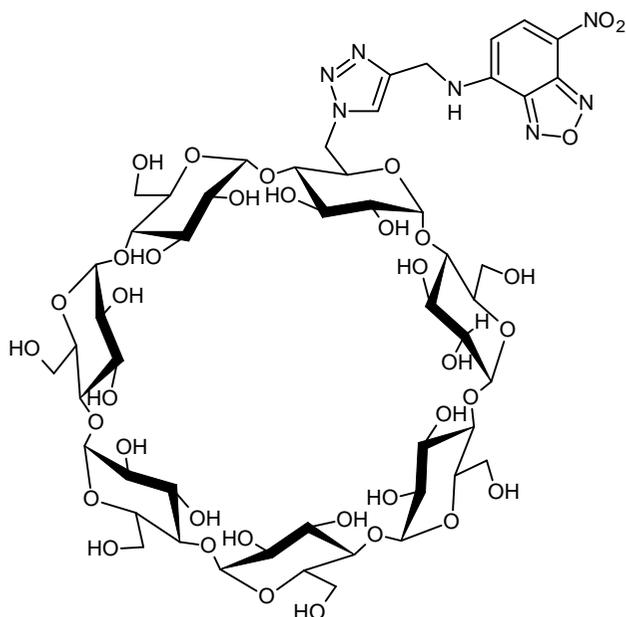
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 111 y 112.

A una disolución de mono-6-azido-6-dexosi- β -ciclodextrina **110** (400 mg, 0.34 mmol) y **86** (298 mg, 1.03 mmol) o **87** (226 mg, 1.03 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se le añadió $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$ (18 mg, 0.052 mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500W, 80°C, 30min). El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna.



Mediante cromatografía en columna (CH_3CN -tolueno 1:1, $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 4:1) se obtuvo **111** como un sólido (400 mg, 80%).

P.f.: $>275^\circ\text{C}$ descompone; $[\alpha]_D +71^\circ$ (c 1, H_2O); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3372, 1637, 1455, 1413, 1331, 1146, 1117, 1029; **$^1\text{H-RMN}$** (DMSO-d_6 , 300MHz) señales seleccionadas: δ 8.47 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-2dan), 8.29 (d, 1H, $J=8.7$ Hz, H-8dan), 8.13 (d, 1H, $J=7.0$ Hz, H-4dan), 7.69 (s, 1H, H-triazol), 7.63 (t, 1H, $J=7.9$ Hz) y 7.59 (t, 1H, $J=8.4\text{Hz}$)[H-3,7dan], 7.26 (d, 1H, $J=7.5$ Hz, H-6dan), 5.87-5.57 (m, OH), 2.77 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (DMSO-d_6 , 75 MHz): δ 151.3, 143.1, 135.8, 129.4, 129.0, 128.4, 127.9, 123.5, 119.1, 115.1, 102.0, 101.8 (C-1), 81.6 (C-5), 73.0-71.6 (C-2,3,4), 59.9 (C-6), 45.1 ($2\times\text{CH}_3$), 37.9, 50.5 (CH_2N); **EM-AR:** (MALDI-TOF) cal. para $\text{C}_{57}\text{H}_{85}\text{N}_5\text{O}_{36}\text{SNa}$: 1470.46; enc.: 1470.65.

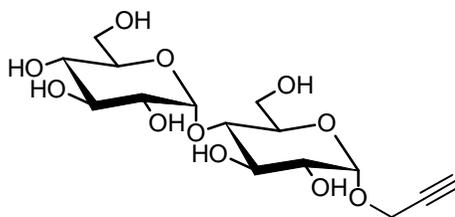


Mediante cromatografía en columna (CH₃CN-tolueno 1:1, CH₃CN-H₂O 3:1) se obtuvo **392** como un sólido (423mg, 89%).

P.f.: >280°C descompone; $[\alpha]_D +77$ (c 1, H₂O); **IR** (KBr, cm⁻¹): 3412, 1629, 1577, 1455, 1414, 1303, 1150, 1116, 1028; **¹H-RMN** (DMSO-d₆, 300MHz) señales seleccionadas: δ 8.50 (sa, 1H, H-6NBD), 8.07 (s, 1H, H-5triazol), 6.53 (sa, 1H, H-5NBD); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75MHz): δ 124.5, 104.2, 102.1, 101.8, 101.3, 83.2, 81.8, 81.4, 73.1, 72.9, 72.7, 72.3, 72.1, 71.9, 71.6, 69.9, 59.9, 59.8, 59.1.; **EM-AR:** (MALDI-TOF) cal. para C₅₁H₇₅O₃₇N₇Na: 1400.410; enc.: 1400.428.

Síntesis del α -propargil maltósido.

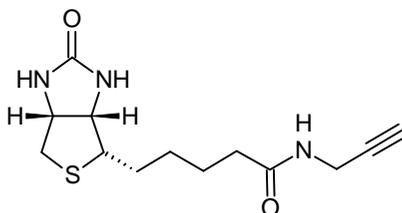
A una disolución de maltosa (360 mg, 1 mmol) en alcohol propargílico (6 mL) se le añadió ácido canforsulfónico (36 mg) y se irradió con M.W. (400W, 70°C, 1 hora). El alcohol propargílico se eliminó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt:MeOH 5:1 \rightarrow AcOEt:MeOH 3:1) obteniéndose el **α -propargil maltósido** como un sirope (40 mg, 10%).



$[\alpha]_D +134$ (c 1, H₂O); ¹H-RMN (MeOD, 300MHz): δ 5.15 (d, 1H, $J=3.7$ Hz), 4.99 (d, 1H, $J=3.7$ Hz), 4.30 (d, 2H, $J=2.5$ Hz), 3.88-3.26 (varios m, 18H), 2.86 (t, 1H, $J=2.4$ Hz); ¹³C-RMN (MeOD, 75MHz): δ 102.9, 98.6, 81.5, 76.1, 75.1, 74.8x2, 74.3, 72.9, 72.7, 71.5, 62.8, 61.9, 55.5.

Síntesis del compuesto propargil-biotina **115**⁴⁰⁰.

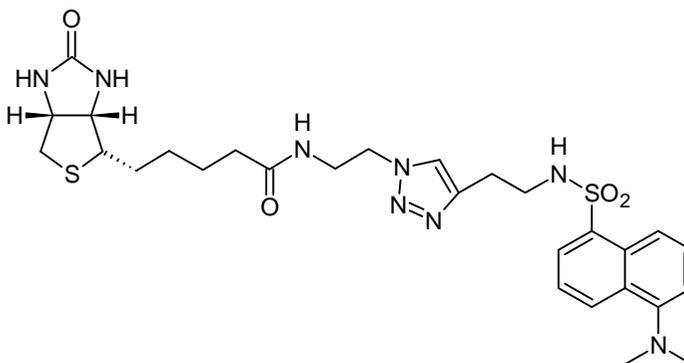
Una disolución de biotina (200 mg, 0.82 mmol) en Cl₂SO (5 mL) se mantuvo a temperatura ambiente bajo agitación magnética durante 1 hora. El exceso de Cl₂SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro (3x15 mL). El crudo obtenido se disolvió en acetonitrilo anhidro (15 mL) y se le adicionaron propargilamina (90 mg, 1.64 mmol) y Et₃N (350 μ L, 2.46 mmol) disueltos en acetonitrilo anhidro (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 5:1) obteniéndose **115** como un sólido (195mg, 85%).



P.f.: 163-165 °C; $[\alpha]_D^{+75}$ (c 1 MeOH); **IR** (film, cm^{-1}): 3283, 1701, 1645, 1543; **$^1\text{H-RMN}$** (MeOD- d_4 , 300 MHz): δ 4.48 (dd, 1H, $J = 7.8$ y 4.8 Hz) y 4.29 (dd, 1H, $J = 7.8$ y 4.5 Hz)[H-3,4], 3.93 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 3.19 (m, 1H, H-2), 2.92 (dd, 1H, $J = 12.7$ y 5.0 Hz), 2.69(d, 1H, $J = 12.7$ Hz), 2.56 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.21 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH_2CO), 1.70-1.30 (varios m, 6H, 2H-1', 2H-2', 2H-3'); **$^{13}\text{C-RMN}$** (MeOD- d_4 , 75 MHz): δ 175.3, 165.7, 80.4, 71.8, 63.0, 61.3, 56.7, 40.9, 36.3, 29.4, 29.3, 29.1, 26.4; **EM-AR:** (FAB+) calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{SNa}$: 304.1096; Enc.: 304.1097.

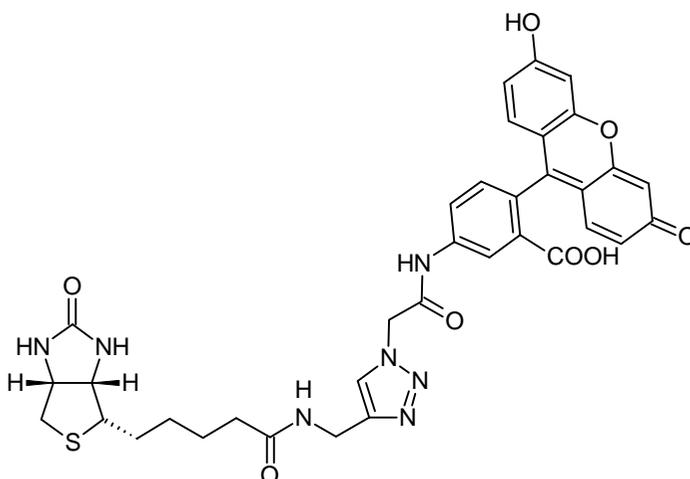
Procedimiento general para la síntesis de los compuestos 113 y 116.

A una disolución de **87** (122 mg, 0.42 mmol) y azidoetilbiotina **64** (110 mg, 0.35 mmol) o de **67** (180 mg, 0.42 mmol) y propargilbiotina **115** (98 mg, 0.35 mmol) en MeOH (15 mL) se le añadió $(\text{EtO})_3\text{P}\cdot\text{CuI}$ (12 mg, 0.035 mmol). La mezcla de reacción se irradió con MW (500W, 65°C, 40min). El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna.



Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 4:1) se obtuvo **113** como un sólido (197mg, 93%).

IR (KBr, cm^{-1}): 3379, 3291, 1688, 1569, 1456, 1314, 1141, 1073; **$^1\text{H-RMN}$** (MeOD- d_4 , 400MHz): δ 8.52 (dd, 1H, $J = 8.4$ y 0.8 Hz, H-2dan), 8.29 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-8dan), 8.18 (dd, 1H, $J = 7.4$ y 1.2 Hz, H-4dan), 7.58-7.53 (m, 2H, H-3, 7dan), 7.49 (s, 1H, H-triazol), 7.25 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-6dan), 4.45 (m, 1H), 4.28 (m, 3H), 4.14 (s, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.17 (m, 1H), 2.91 (dd, 1H, $J = 12.7$ y 5.1 Hz), 2.86(s, 6H, 2x CH_3), 2.67 (d, 2H, $J = 12.7$ Hz), 2.12 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 1.69-1.27 (varios m, 6H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (MeOH- d_4 , 75MHz): δ 176.4, 166.1, 153.2, 136.5, 131.2, 131.1, 130.9, 130.4, 129.2, 124.7, 124.4, 120.4, 116.4, 63.3, 61.6, 57.0, 50.3, 45.8, 41.2, 40.3, 39.0, 36.0, 29.6, 29.4, 26.3.



Mediante cromatografía en columna (AcOEt-MeOH 2:1 a AcOEt-MeOH 1:3) se obtuvo **116** como un sólido (216mg, 87%).

¹H-RMN (DMSO-d₆, 300MHz): δ 8.42-8.24 (varios m, 2H), 7.95-7.84 (varios m, 2H), 7.05 (d, 1H, *J*=8.2 Hz), 6.68 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.19-6.12 (varios m, 3H), 5.34 (sa, 2H) 4.35-4.61 (varios m, 3H), 4.14 (m, 1H), 3.13 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, *J*=12.5 y 5 Hz), 2.58 (d, 1H, *J*=12.6 Hz), 2.15 (m, 2H), 1.61-1.25 (varios m, 6H);

¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75MHz): δ 171.9, 169.0, 164.3, 162.6, 156.7, 130.0, 124.2, 121.2, 109.8, 102.3, 60.9, 59.1, 55.3, 39.7, 34.9, 34.0, 28.1, 27.9, 25.1. .

ENSAYOS DE FLUORESCENCIA.

Los experimentos de anisotropía de fluorescencia para la interacción ligando fluorescente-receptor se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian dotado de los polarizadores necesarios para llevar a cabo las medidas de anisotropía. Para el control de la temperatura se utilizó un refrigerador Peltier. En el caso de los ensayos realizados con la ConA y con la MBP se utilizó una cubeta de cuarzo HELLMA con un paso de luz de 10x4 mm y se trabajó con volúmenes de 400 µL de disolución, mientras que en el caso de los ensayos con avidina la cubeta tenía un paso de luz de 10x10 mm y el volumen inicial de disolución era de 3 mL.

El factor G para los diferentes compuestos se estableció inicialmente y se mantuvo constante en los diferentes experimentos realizados con cada uno de ellos. Los valores de las longitudes de onda de emisión y excitación utilizadas para los diferentes compuestos son las que se detallan a continuación.

Derivado fluorescente	λ excitación nm	λ emisión nm
91, 92, 113	330	555
111	345	525
95, 96, 112	470	540
97, 116	490	525

Para los ajustes de los datos experimentales, tanto de los ensayos directos como de los ensayos de competición, en el caso de la ConA y la MBP se utilizó el programa origin 6.1. En el caso del sistema avidina-biotina el ajuste por mínimos cuadrados de las curvas experimentales se llevó a cabo en una hoja de Excel.

Ensayos con ConA.

Para los ensayos con ConA se preparó una disolución inicial de lectina de 10 mg/mL en el tampón correspondiente, según el caso, la cual se centrifugó para eliminar el material insoluble y su concentración se determinó a través de su coeficiente de absorción $A(1\%,280\text{nm})$ 12.4^{411} . Se prepararon disoluciones con una concentración constante de glicoconjugado fluorescente (10 μM para **91** y **92**, 2 μM para **95** y **96** y 0.2 μM para **97**) y concentraciones crecientes de ConA (0-260 μM). Para cada concentración se prepararon tres réplicas cada una de las cuales se midió seis veces a cada una de las temperaturas de trabajo.

Para los ensayos de competición se prepararon disoluciones con una concentración constante de **97** (0.2 μM) y de ConA (14-18 μM) y cantidades crecientes del ligando no fluorescente cuyo rango varía en función de la afinidad. Para el caso concreto del metil α -D-manopiranosido el rango fue 0-1 mM. De cada disolución se prepararon tres réplicas que se midieron seis veces.

411. Banerjee, T.; Kishore, N., A differential scanning calorimetric study on the irreversible thermal unfolding of concanavalin A. *Thermochimica Acta* **2004**, 411, (2), 195-201.

Ensayos con MBP.

En el caso de la MBP la concentración de las disoluciones proporcionadas por el grupo de Rafael Salto se estableció a través de su coeficiente de extinción molar. Con respecto a esta proteína no existe en bibliografía unanimidad en el coeficiente de absorción⁴¹², sin embargo independientemente del coeficiente utilizado se ha comprobado que, aunque las constantes de disociación del ligando fluorescente se ven ligeramente afectadas no ocurre lo mismo con las constantes obtenidas en los ensayos de competición para los ligandos no fluorescentes, a los cuales a penas les afecta que se utilice un coeficiente u otro. El coeficiente que se utilizó fue $A(1\%,280\text{nm})$ 1.55.

Para los ensayos directos se prepararon disoluciones en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, 500 mM con concentraciones constantes de las ciclodextrinas fluorescentes (2 μM para **112** y 5 μM para **111**) y concentraciones crecientes de MBP (0-25 μM). De cada disolución se prepararon dos réplicas que se midieron seis veces.

Para los ensayos de competición se prepararon disoluciones con una concentración constante de **112** (2 μM) y de MBP (2.6-2.9 μM) y cantidades crecientes del ligando no fluorescente cuyo rango varía en función de la afinidad. Para la maltosa 0-62.5 μM , para la β -CD y el α -propargil maltósido 0-125 μM y para el β -propargil maltósido 0-360 μM . De cada disolución se prepararon tres réplicas que se midieron seis veces.

Ensayos con avidina.

Para la avidina el coeficiente de absorción utilizado para la medida de su concentración fue el suministrado por Sigma-Aldrich (15.7)

Para estos ensayos se partió de 3 mL de una disolución del derivado fluorescente en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 NaCl 100 mM y se llevaron acabo adicciones de 10 μL de la disolución de avidina correspondiente (para **113** 0.7 μM y

412. Ganesh, C.; Shah, A. N.; Swaminathan, C. P.; Surolia, A.; Varadarajan, R., Thermodynamic characterization of the reversible, two-state unfolding of maltose binding protein, a large two-domain protein. *Biochemistry* **1997**, 36, (16), 5020-5028.

Capítulo 3

0.35 μM y **116** 0.4 μM la disolución de avidina tenía una concentración de ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para **116** 0.2 μM era de ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para **116** 0.04 μM era de ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La valoración se llevó a cabo por duplicado en cada una de las condiciones ensayadas. Debido a las adiciones de avidina el volumen de la disolución varía durante la valoración. En el caso de los datos de anisotropía de fluorescencia los valores no se encuentran corregidos, pues no lo requieren, sin embargo si que lo están los datos de intensidad de fluorescencia.

CAPÍTULO 4

SÍLICE-VINILSULFONA. SÍNTESIS Y APLICACIONES EN INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE PROTEÍNAS

Capítulo 4.

SÍLICE-VINILSULFONA. SÍNTESIS Y APLICACIONES EN INMOVILIZACIÓN COVALENTE DE PROTEÍNAS.

4.1. Inmovilización de biomoléculas

La inmovilización de biomoléculas es una técnica fundamental en Biología y en las áreas relacionadas, con múltiples aplicaciones ya desarrolladas y otras aún por desarrollar. La inmovilización de macromoléculas a soportes sólidos se remonta a comienzos del siglo XX con los trabajos de Nelson y Griffin⁴¹³ sobre inmovilización de invertasa.¹⁰² El interés inicial por la inmovilización de enzimas y su actividad catalítica se ha ido extendiendo a otras macromoléculas. En la actualidad, la inmovilización de macromoléculas sobre un soporte sólido y el concepto de afinidad entre moléculas juegan un papel central en lo que se ha dado en denominar la era de las “omics”⁴¹⁴. En este contexto se han descrito numerosas aproximaciones para inmovilizar macromoléculas a soportes con el objeto de fabricar microarrays⁴¹⁵.

En general, los métodos de inmovilización de biomoléculas^{416,417}, y más concretamente de proteínas se suelen clasificar en dos grandes grupos: inmovilización **no covalente** e inmovilización **covalente**. A su vez, dentro de cada grupo existen diferentes posibilidades, que se describen brevemente a continuación.

413. Nelson, J. M.; Griffin, E. G., Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society* **1916**, 38, 1109-1115.

414. Ward, D. C.; White, D. C., The new 'omics era. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, (1), 11-13.

415. Sun, H.; Chattopadhyaya, S.; Wang, J.; Yao, S. Q., Recent developments in microarray-based enzyme assays: from functional annotation to substrate/inhibitor fingerprinting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 386, (3), 416-426.

416. Gauthier, M. A.; Klok, H. A., Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts. *Chemical Communications* **2008**, (23), 2591-2611.

417. Rusmini, F.; Zhong, Z. Y.; Feijen, J., Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (6), 1775-1789.

4.1.1. Inmovilización no-covalente.

Adsorción: la proteína se une a un soporte sin funcionalizar a través de interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno. Que participe uno u otro tipo de interacción depende de la naturaleza de la proteína y de la superficie del soporte. Los principales factores que influyen en el proceso de adsorción son el pH del medio, la fuerza iónica y el diámetro del poro. El inconveniente que presenta esta metodología es que da lugar a una orientación arbitraria y a una unión débil y reversible. De hecho, las proteínas inmovilizadas a través de esta metodología se pueden desorber modificando pH y/o fuerza iónica o mediante el empleo de ciertos detergentes.

Un método de inmovilización física más elaborado es el **atrapamiento**. Consiste en la retención física del enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa. En este caso la inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión del enzima o proteína en una solución de monómero que seguidamente es polimerizado por un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico. Otra posibilidad consiste en la **inclusión de la proteína en membranas**.

Existen diversas metodologías que permiten llevar a cabo inmovilizaciones no covalentes específicas mediante la utilización de la afinidad existente entre diversos sistemas. Estas metodologías reciben el nombre genérico de inmovilización por **bioafinidad**. Así, mediante técnicas de Biología Molecular las proteínas pueden ser “activadas” vía fusión a colas o dominios proteicos que confieren afinidad por el soporte. En la **tabla 4.1**. se recogen algunas de estas posibilidades actualmente disponibles en el mercado.

Cola	Soporte	Disponibilidad Comercial
His-Tag: histidina ⁴¹⁸ .	Soportes con Ni	Quiagen, IBA, Amersham-Bioscience, Clontech
Halo-Tag: fragmento de la haloalcano deshalogenasa	Soportes con haloalcano	Promega
SNAP: O-6-Alquilguanina- ADN alquiltransferasa ⁴¹⁹	Soportes con O-6-bencilguanina	Covalys
Strep-tag: péptido con afinidad por estreptavidina ⁴²⁰	Soportes con estreptavidina	Novagen, IBA, Quiagen, Stratagene
Glutation transferasa	Soportes con glutation	Novagen, Clontech, Amersham-Biosciences
Proteína de unión a maltosa ⁴²¹	Soportes con maltosa	New England Biolabs
Péptido de unión a calmodulina ⁴²²	Soportes con calmodulina	Stratagene
Dominio de unión a celulosa ⁴²³	Soportes con celulosa	Novagen

Tabla 4.1. Soportes comerciales empleados en la inmovilización por bioafinidad.

La metodología más empleada es la incorporación de colas de histidina debido a las ventajas que presenta: pequeño tamaño, compatibilidad con disolventes orgánicos, baja inmunogeneidad y además permite una purificación efectiva bajo condiciones tanto nativas como desnaturalizantes. Esta aproximación está limitada a proteínas recombinantes y conduce a una inmovilización reversible de la macromolécula, de ahí su aplicación a purificación de proteínas mediante

418. Hengen, P. N., Methods and reagents - purification of his-tag fusion proteins from Escherichia-Coli. *Trends in Biochemical Sciences* **1995**, 20, (7), 285-286.

419. Keppler, A.; Kindermann, M.; Gendreizig, S.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K., Labeling of fusion proteins of O-6-alkylguanina-DNA alquiltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* **2004**, 32, (4), 437-444.

420. Schmidt, T. G. M.; Koepke, J.; Frank, R.; Skerra, A., Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *Journal of Molecular Biology* **1996**, 255, (5), 753-766.

421. di Guan, C.; Li, P.; Riggs, P. D.; Inouye, H., Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **1988**, 67, (1), 21-30.

422. Vaillancourt, P.; Simcox, T. G.; Zheng, C. F., Recovery of polypeptides cleaved from purified calmodulin-binding peptide fusion proteins. *BioTechniques* **1997**, 22, (3), 451-3.

423. Novy, R.; Yaeger, K.; Monsma, S.; McCormick, M.; Berg, J.; Shoseyov, O.; Shpigel, E.; Seigel, D.; Goldlust, A.; Efroni, G.; Singer, Y.; Kilburn, D.; Tomme, P.; Gilkes, N., Cellulose binding domain expression vectors for the rapid, low cost purification of CBD-fusion proteins. *Faseb Journal* **1997**, 11, (9), A1151-A1151.

cromatografía de afinidad⁴²⁴.

Otra metodología de inmovilización no covalente de biomoléculas se basa en la elevada afinidad avidina-biotina⁴²⁵, que como se comentó en el **capítulo 2** de esta memoria ha encontrado una amplia aplicación en biotecnología..

4.1.2. Inmovilización covalente.

Se basa en la formación de un enlace covalente entre la molécula a inmovilizar y el soporte.

Entre las numerosas estrategias destaca el **reticulado**, también conocido como entrecruzamiento o “cross-linking”. Este método consiste en el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares entre moléculas de proteína. Como reactivos bifuncionales se emplean dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos, sales de bisdiazonio, etc... Esta técnica se ha utilizado extensamente en la estabilización de muchas enzimas⁴²⁶ ya que el entrecruzamiento da lugar a enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles que hacen que sean capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura. En ocasiones se lleva a cabo lo que se conoce como **co-reticulado**, que consiste en el entrecruzamiento del enzima con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina, como por ejemplo el BSA⁴²⁷. Con ello se consiguen evitar pérdidas de actividad enzimática.

La **inmovilización covalente sobre soportes** asegura la no desorción de la biomolécula, aunque como contrapartida puede introducir distorsiones en la estructura de la misma, especialmente cuando el número de enlaces con el soporte es alto, o afectar a grupos reactivos implicados en su función o actividad catalítica. Sin embargo, la posible pérdida de funcionalidad queda claramente compensada por el efecto estabilizador que proporciona el establecimiento de un alto número

424. Lee, W.-C.; Lee, K. H., Applications of affinity chromatography in proteomics. *Anal. Biochem.* **2004**, 324, (1), 1-10.

425. Sun, X. L.; Faucher, K. M.; Houston, M.; Grande, D.; Chaikof, E. L., Design and synthesis of biotin chain-terminated glycopolymers for surface glycoengineering. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (25), 7258-7259.

426. Wong, S. S.; Wong, L. J. C., Chemical cross-linking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* **1992**, 14, (11), 866-874.

427. Basu, A. K.; Chattopadhyay, P.; Roychoudhuri, U.; Chakraborty, R., Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry* **2007**, 70, (2), 375-379.

de enlaces entre ambas especies: enzima y soporte⁴²⁸. Desde un punto de vista industrial la inmovilización covalente sobre soportes es de los más atractivos.

Existe una gran variedad de materiales que pueden utilizarse como soportes, los cuales difieren en tamaño, densidad, porosidad y forma. Pueden clasificarse en dos grandes grupos:

Soportes inorgánicos: pueden ser naturales como las arcillas, piedra pómez... o materiales manufacturados como óxidos de metales, vidrio de tamaño de poro controlado, vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice...

Soportes orgánicos: comprenden dos grandes grupos:

✓ polímeros naturales que se subdividen en polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agarosa, quitina, quitosano...) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina....)

✓ polímeros sintético: poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos...) y de otra naturaleza como alcohol polivinílico, poliamidas...

Para promover esta inmovilización covalente existen, básicamente, dos métodos: a) activación del soporte o b) activación de la macromolécula a inmovilizar.

La primera de las metodologías (**activación del soporte**) supone la funcionalización del soporte con grupos químicos que sean capaces de reaccionar con los grupos funcionales de la proteína o biomolécula. De los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las proteínas los que potencialmente pueden ser empleados para la formación de enlaces con el soporte son la lisina, la cisteína, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y los ácidos aspártico y glutámico. El resto de los aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica y no pueden intervenir en la unión covalente.

428. Gianfreda, L.; Scarfi, M. R., ENZYME STABILIZATION - STATE-OF-THE-ART. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1991**, 100, (2), 97-128.

Capítulo 4

Al igual que en el etiquetado, los residuos de **lisina** son los que más se utilizan en la inmovilización de proteínas ya que éstos suelen encontrarse en la superficie. Un inconveniente que presenta el empleo de este residuo es que en ocasiones su abundancia da lugar a múltiples puntos de unión que conducen a un aumento de la heterogeneidad y una restricción de la flexibilidad conformacional. Las funcionalizaciones del soporte que más se suelen emplear en estos casos son:

- ✓ N-hidroxisuccinimidil ésteres⁴²⁹.
- ✓ Aldehídos⁴³⁰.
- ✓ Isocianatos o isotiocianatos⁴³¹.

Otro residuo que también se utiliza con relativa frecuencia son los residuos de **cisteína** para los cuales se utilizan algunas de las siguientes funcionalizaciones:

- ✓ Maleimidias⁴³².
- ✓ Yodo-acetamidas⁴³³.
- ✓ Reactivos con enlaces disulfuro⁴³⁴.

429. Dauphas, S.; Corlu, A.; Guguen-Guillouzo, C.; Ababou-Girard, S.; Lavastre, O.; Geneste, F., Covalent immobilization of antibodies on electrochemically functionalized carbon surfaces. *New Journal of Chemistry* **2008**, 32, (7), 1228-1234.

430. Avseenko, N. V.; Morozova, T. Y.; Ataullakhanov, F. I.; Morozov, V. N., Immobilization of proteins in immunochemical microarrays fabricated by electrospray deposition. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (24), 6047-6052.

431. Preininger, C.; Sauer, U.; Kern, W.; Dayteg, J., Photoactivatable copolymers of vinylbenzyl thiocyanate as immobilization matrix for biochips. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (20), 6130-6136.

432. De Lorimier, R. M.; Tian, Y. J.; Hellinga, H. W., Binding and signaling of surface-immobilized reagentless fluorescent biosensors derived from periplasmic binding proteins. *Protein Science* **2006**, 15, (8), 1936-1944.

433. Mallik, R.; Wa, C. L.; Hage, D. S., Development of sulfhydryl-reactive silica for protein immobilization in high-performance affinity chromatography. *Analytical Chemistry* **2007**, 79, (4), 1411-1424.

434. Iwasaki, Y.; Omichi, Y.; Iwato, R., Site-specific dense immobilization of antibody fragments on polymer brushes supported by silicone nanofilaments. *Langmuir* **2008**, 24, (16), 8427-8430.

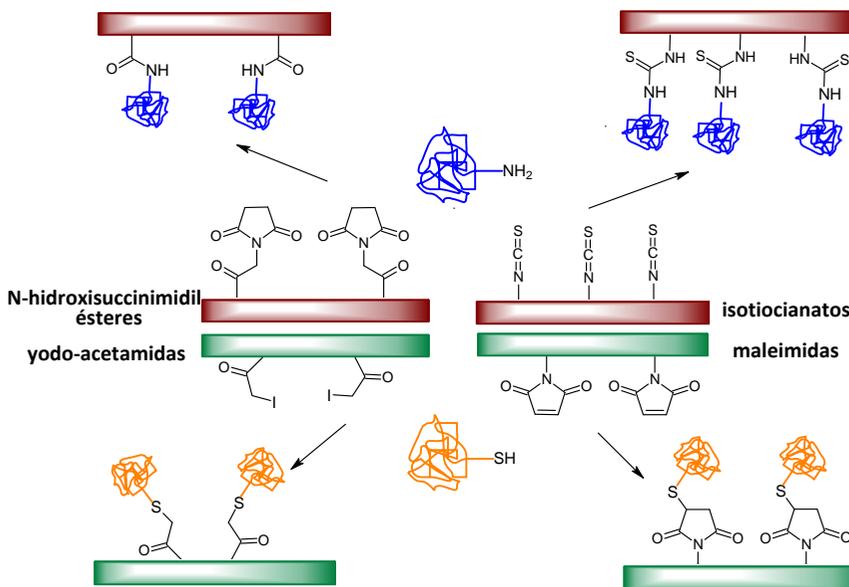


Figura 4.1. Representación de algunas de las funcionalizaciones empleadas para la inmovilización covalente de proteínas.

La inmovilización de glicoproteínas, incluyendo anticuerpos, hormonas y enzimas, puede llevarse a cabo a través de las **cadena de carbohidratos**⁴³⁵ sin que por ello se vea afectada la actividad biológica, ya que estas regiones suelen situarse en zonas no implicadas en la actividad. En este caso el protocolo a seguir implica la oxidación con NaIO_4 y la reacción con un soporte que contenga grupos amino o hidrazina. Otra funcionalización empleada para la inmovilización de biomoléculas que contienen carbohidratos han sido los ácidos borónicos (NuGel®) que forman complejos covalentes reversibles con grupos hidroxilos vecinales, como los presentes en la estructura de los azúcares

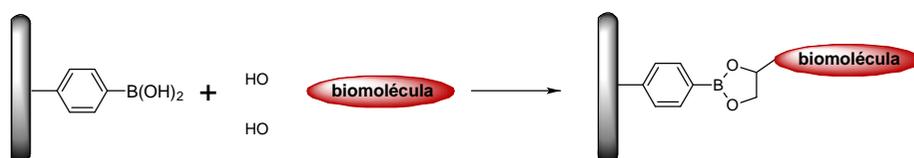


Figura 4.2. Inmovilización de glicoproteínas mediante el empleo de ácidos borónicos.

⁴³⁵ Turkova, J.; Petkov, L.; Sajdok, J.; Kas, J.; Benes, M. J., Carbohydrates as a tool for oriented immobilization of antigens and antibodies. *Journal of Chromatography* **1990**, 500, 585-593.

Otra posibilidad reside en la inmovilización sobre soportes que contienen grupos amino a través de los **grupos carboxilo** mediante la activación con carbodiimidas⁴³⁶. Además, existen soportes fotoreactivos que contienen grupos que se activan con la acción de luz de una longitud de onda apropiada⁴³⁷. Este tipo de soportes no requieren una funcionalización específica de la biomolécula a inmovilizar y son totalmente biocompatibles, ya que los grupos que se suelen utilizar, arilazidas, aziridinas, benzofenonas.... se activan mediante radiación a $\lambda > 350$ nm para la cual la mayoría de las biomoléculas son transparentes.

La segunda de las metodologías, es decir, la **activación de la macromolécula**, implica la introducción de grupos químicos en la estructura de la biomolécula que le confieran reactividad o sobre los que se pueda llevar cabo posteriores transformaciones químicas. En el caso de proteínas esta incorporación suele llevarse a cabo mediante mutagénesis dirigida, la cual permite introducir el grupo reactivo en posiciones concretas de la estructura y, por lo tanto, una posterior inmovilización orientada de la misma. Los grupos reactivos que se introducen se eligen en base a su habilidad para intervenir en reacciones selectivas y que transcurran en condiciones suaves. Así, algunas de las reacciones que más se han empleado para este fin son:

- ✓ Reacción de Staudinger⁴³⁸.
- ✓ Cicloadiciones Diels-Alder⁴³⁹.
- ✓ Click chemistry⁴⁴⁰.
- ✓ Reacción de Sonogashira⁴⁴¹.

436. Fernandezlafuente, R.; Rosell, C. M.; Rodriguez, V.; Santana, C.; Soler, G.; Bastida, A.; Guisan, J. M., Preparation of activated supports containing low pk amino-groups - a new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme and Microbial Technology* **1993**, 15, (7), 546-550.

437. Blawas, A. S.; Reichert, W. M., Protein patterning. *Biomaterials* **1998**, 19, (7-9), 595-609.

438. Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T., Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (39), 11790-11791.

439. de Araujo, A. D.; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Kohn, M.; Schroder, H.; Wacker, R.; Niemeyer, C.; Alexandrov, K.; Waldmann, H., Diels-Alder ligation and surface immobilization of proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (2), 296-301.

440. Duckworth, B. P.; Xu, J. H.; Taton, T. A.; Guo, A.; Distefano, M. D., Site-specific, covalent attachment of proteins to a solid surface. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17, (4), 967-974.

441. Bong, D. T.; Ghadiri, M. R., Chemoselective Pd(0)-catalyzed peptide coupling in water. *Organic Letters* **2001**, 3, (16), 2509-2511.

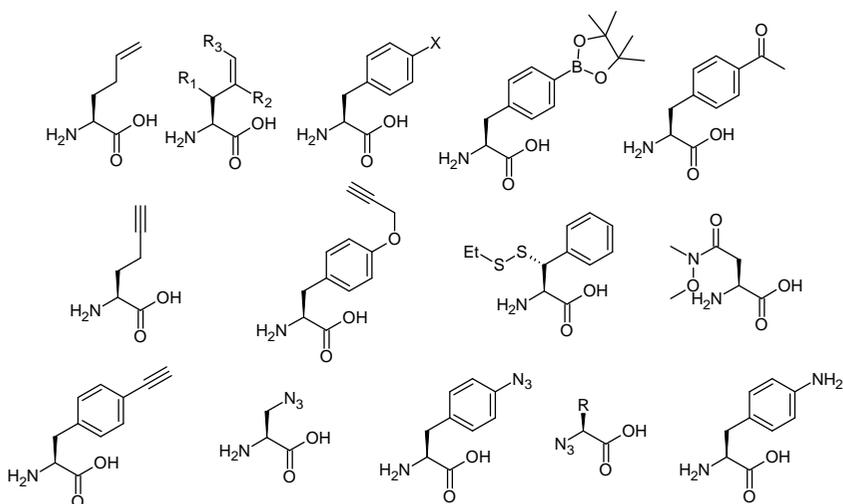


Figura 4.3. Algunos aminoácidos no naturales que se incorporan mediante mutágenesis dirigida para la inmovilización de proteínas.

En la **tabla 4.2.** se resumen las ventajas y los inconvenientes de las diferentes metodologías de inmovilización que se han descrito.

MÉTODO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
Adsorción	Sencillo, bajo coste, no hay cambios de especificidad enzimática.	Optimización de las variables que controlan la adsorción, la unión es débil y reversible y la desorción depende del pH y la fuerza iónica.
Atrapamiento	Universal para cualquier enzima.	Posible desnaturalización debido a la presencia de radicales, grandes barreras difusionales, posible pérdida de proteína por escape, complicada.
Reticulado	Simple, fuerte unión de las biomoléculas, permite la estabilización de enzimas o proteínas adsorbidas.	Es difícil controlar la reacción, requiere grandes cantidades de enzima pues parte actúa como "soporte", baja actividad enzimática.
Unión covalente a soporte sólido	Elevada estabilidad, baja probabilidad de pérdida de biomolécula, ideal para fabricación en serie y comercialización.	Condiciones de reacción complicadas, posible pérdida de actividad como consecuencia de la participación de grupos implicados en la actividad biológica.

Tabla 4.2. Ventajas e inconvenientes de las principales metodologías empleadas para la inmovilización de biomoléculas.

4.2. Aplicaciones de la inmovilización de biomoléculas.

La inmovilización de biomoléculas es un campo muy amplio que presenta multitud de aplicaciones. Debido a su importancia en áreas de muy diversa naturaleza, a continuación se exponen algunas de las posibilidades limitadas a inmovilización de enzimas⁴⁴².

4.2.1. Aplicaciones analíticas.

Los **biosensores**^{443, 444} se están convirtiendo en una herramienta de gran importancia en diversos ámbitos. Una de las principales ventajas del empleo de biosensores reside en su elevada sensibilidad y selectividad. Así por ejemplo, son de gran utilidad en el campo del diagnóstico clínico, existiendo electrodos disponibles comercialmente que permiten detectar los niveles séricos de glucosa, lactato y ácido úrico. También han encontrado hueco en el control de calidad en las industrias alimentarias pues existen biosensores que permiten determinar el grado de contaminación microbiana o cuantificar el azúcar presente en bebidas. Además también presentan utilidad en el control de polución medioambiental.

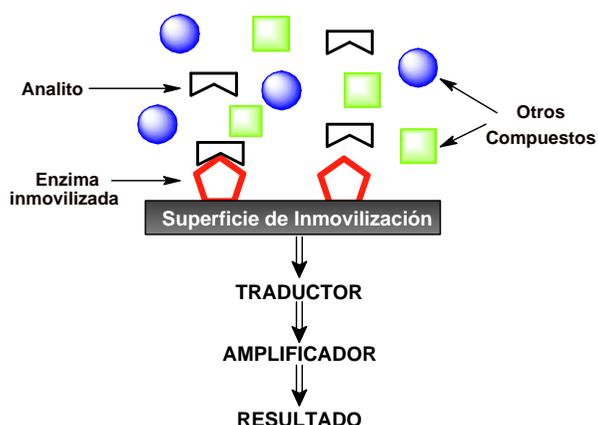


Figura 4.4. Componentes de un biosensor.

⁴⁴².Katchalskikatzir, E., Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology* **1993**, 11, (11), 471-478.

⁴⁴³.Griffiths, D.; Hall, G., Biosensors - what real progress is being made. *Trends in Biotechnology* **1993**, 11, (4), 122-130.

⁴⁴⁴.Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brown, R. S., Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in Biotechnology* **1995**, 13, (5), 178-185.

4.2.2. Aplicaciones médicas

Existe un gran número de enfermedades causadas por la alteración o carencia de una determinada enzima y, además, existen enzimas con actividad antitumoral, cicatrizante así como otras acciones terapéuticas. En este contexto, el tratamiento con dichas enzimas tiene un claro potencial y su inmovilización^{445,446} es una estrategia atractiva para hacerlas más resistentes a proteasas y conseguir una acción más prolongada.

4.2.3. Aplicaciones industriales

La inmovilización de enzimas tiene gran importancia industrial como medio de estabilización y en reactores enzimáticos donde la inmovilización facilita la separación del producto del enzima y permite el uso de la misma varias veces con la consiguiente reducción de costes de producción. A continuación se recogen una serie de ejemplos en dos industrias de gran importancia, la industria farmacéutica y la alimentaria.

4.2.3.1 Aplicaciones en la Industria Farmacéutica.

La actividad biológica, la toxicidad, la distribución y el metabolismo de un fármaco dependen en gran medida de su estereoquímica. En numerosas ocasiones, para la obtención de fármacos ópticamente puros la industria farmacéutica recurre a métodos enzimáticos. Así por ejemplo, para la obtención de antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, aproximo o ketoprofeno) se utilizan lipasas microbianas inmovilizadas⁴⁴⁷. El ácido 6-amino penicilánico (6-APA), precursor de las penicilinas semisintéticas (amoxicilina, ampicilina...), se obtiene industrialmente mediante la

445. Callegaro, L.; Denti, E., Applications of bioreactors in medicine. *International Journal of Artificial Organs* **1983**, 6, 107-110.

446. Vlasov, L. G.; Tolstykh, P. I.; Ignatyuk, T. E.; Razzakov, O. N., Preparation of lysozyme immobilized on textile carriers and its use in treatment of purulent wounds. *Antibiotiki i Khimioterapiya* **1988**, 33, (11), 848-50.

447. Arroyo, M.; Sinisterra, J. V., High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from candida-antarctica - a mechanistic approach. *Journal of Organic Chemistry* **1994**, 59, (16), 4410-4417.

hidrólisis de la penicilina G catalizada por las penicilina G acilasas inmovilizadas⁴⁴⁸ (figura 4.5.).

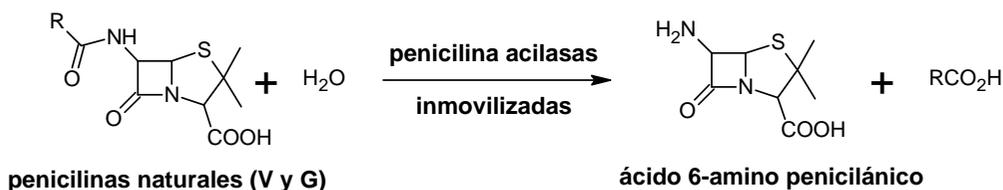


Figura 4.5. Obtención de precursores de antibióticos semisintéticos mediante enzimas inmovilizadas.

4.2.3.2. Aplicaciones en la Industria Alimentaria.

Un gran número de enzimas se emplean en el procesado, la preparación y la conservación de los alimentos. Normalmente, una vez concluido el tratamiento las enzimas solubles añadidas se inactivan por calentamiento. La inmovilización permite la reutilización de las enzimas tanto en operaciones continuas como discontinuas. Algunos de los procesos de la industria alimentaria donde se han aplicado enzimas inmovilizadas son:

- ✓ Hidrólisis de proteínas: las enzimas proteolíticas se emplean en la modificación del contenido proteico de los alimentos⁴⁴⁹.
- ✓ Hidrólisis de hidratos de carbono: la presencia de lactosa en la leche y en algunos derivados lácteos es perjudicial para aquellas personas que carecen de lactasa intestinal. La eliminación de este azúcar se puede llevar a cabo mediante el tratamiento con β-galactosidasa de levaduras inmovilizada en fibras de acetato de celulosa y es de gran importancia en la preparación de productos lácteos y dietéticos⁴⁴².
- ✓ Algunas lipasas y proteasas encapsuladas se están empleando en la maduración de quesos⁴⁵⁰.

448. Vandamme, E. J., Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology. *Enzyme and Microbial Technology* **1983**, 5, (6), 403-416.

449. Vuilleumard, J. C.; Goulet, J.; Amiot, J.; Vijayalakshmi, M. A.; Terre, S., Continuous production of small peptides from milk-proteins by extracellular proteases of free and immobilized serratiamarcescens cells. *Enzyme and Microbial Technology* **1988**, 10, (1), 2-&.

450. Magee, E. L.; Olson, N. F.; Lindsay, R. C., Microencapsulation of cheese ripening system - production of diacetyl and acetoin in cheese by encapsulated bacterial cell-free-extract. *Journal of Dairy Science* **1981**, 64, (4), 616-621.

- ✓ La obtención industrial de ácido L-málico, que es un aditivo importante para zumos de frutas refrescos, mermeladas y dulces, se lleva a cabo mediante la fumarasa de *Brevibacterium flavum* atrapada en K-carragatano⁴⁵¹. Además, las enzimas inmovilizadas permiten la obtención industrial de edulcorantes alimentarios como el aspartamo⁴⁵².

4.2.4. Aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales.

Existe un método para la reducción de nitratos a nitritos en aguas residuales que emplea enzimas inmovilizadas⁴⁵³ y el benceno, que es un compuesto muy tóxico, puede ser degradado mediante células de *Pseudomonas putida* atrapadas en geles de poliacrilamida⁴⁵⁴

451 Yamamoto, K.; Tosa, T.; Yamashita, K.; Chibata, I., Continuous production of l-malic acid by immobilized *brevibacterium ammoniagenes* cells. *European Journal of Applied Microbiology* **1976**, 3, (3), 169-183.

452 Miyanaga, M.; Tanaka, T.; Sakiyama, T.; Nakanishi, K., Synthesis of aspartame precursor with an immobilized thermolysin in mixed organic-solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **1995**, 46, (6), 631-635.

453 Mellor, R. B.; Ronnenberg, J.; Campbell, W. H.; Diekmann, S., Reduction of nitrate and nitrite in water by immobilized enzymes. *Nature* **1992**, 355, (6362), 717-719.

454 Chibata, I.; Tosa, T., ENZYME TECHNOLOGY .3. Immobilized microbial-cells and their applications. *Trends in Biochemical Sciences* **1980**, 5, (4), 88-90.

4.2.5. Otras aplicaciones.

La inmovilización de biomoléculas juega un papel central en lo que se ha venido denominando era de las “omics”. Así, en la tecnología microarray⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁸ la inmovilización de proteínas ácidos nucleicos, carbohidratos y biomoléculas en general es un paso clave, al igual que ocurre para la cromatografía de afinidad⁴⁵⁹⁻⁴⁶¹, cuya potencialidad no se reduce al campo de las purificaciones sino que además permite llevar a cabo estudios de interacción y reconocimiento vía experimentos de “pull-down”⁴⁶².

455.Heise, C.; Bier, F. F., Immobilization of DNA on microarrays. *Topics in Current Chemistry* **2005**, 261, (Immobilisation of DNA on Chips II), 1-25.

456.Bar-Ziv, R.; Morpurgo, M.; Buxboim, A.; Bar-Dagan, M.; Frydman, V.; Zbaida, D. A single-step platform for on-chip immobilization and integration of biomolecules in arrays. 2005-IL1352 2006064505, 20051215., 2006.

457.de Boer, A. R.; Hokke, C. H.; Deelder, A. M.; Wührer, M., General Microarray Technique for Immobilization and Screening of Natural Glycans. *Analytical Chemistry (Washington, DC, United States)* **2007**, 79, (21), 8107-8113.

458.Lee, M.-r.; Shin, I., Fabrication of chemical microarrays by efficient immobilization of hydrazide-linked substances on epoxide-coated glass surfaces. *Angewandte Chemie, International Edition* **2005**, 44, (19), 2881-2884.

459.Schiel, J. E.; Mallik, R.; Soman, S.; Joseph, K. S.; Hage, D. S., Applications of silica supports in affinity chromatography. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, (6), 719-737.

460.Caron, M.; Seve, A. P.; Bladier, D.; Joubert-Caron, R., Glycoaffinity chromatography and biological recognition. *Journal of Chromatography B* **1998**, 715, (1), 153-161.

461.Sii, D.; Sadana, A., Bioseparation using affinity techniques. *Journal of Biotechnology* **1991**, 19, (1), 83-98.

462.Becamel, C.; Galeotti, N.; Poncet, J.; Jouin, P.; Dumuis, A.; Bockaert, J.; Marin, P., A proteomic approach based on peptide affinity chromatography, 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify multiprotein complexes interacting with membrane-bound receptors. *Biol. Proced. Online* **2002**, 4, (1), 94-104.

4.3. Discusión y resultados.

4.3.1. Funcionalización de sílica con grupos vinilsulfona.

Con la intención de desarrollar un procedimiento rápido, eficiente y barato para la inmovilización de biomoléculas y, más concretamente, de proteínas, fijamos nuestra atención en las vinilsulfonas como grupo reactivo y en la sílica como un soporte sólido universal susceptible de ser modificado con esta funcionalización.

Como se puso de manifiesto en el **capítulo 2** de esta Tesis, las vinilsulfonas son capaces de reaccionar con grupos nucleófilos presentes en las proteínas en condiciones suaves y sin que se generen subproductos, propiedades que las hacen atractivas para llevar a cabo la inmovilización de proteínas y biomoléculas en general. La alta reactividad del grupo vinilsulfona ya ha sido explotada previamente en la preparación de distintos materiales conteniendo esta funcionalización:

- ✓ Poliestireno, comercializado por Aldrich.
- ✓ Agarosa, comercializada por Gentaur.
- ✓ Sefarosa comercializada por Affiland.

El uso de sílica como material para soportar grupos vinilsulfona proporciona una serie de importantes ventajas con respecto a otros materiales poliméricos como, por ejemplo, polisacáridos o poliestireno, entre las que destacan:

- ✓ **Estabilidad mecánica.** La sílica puede ser sometida a agitación mecánica sin sufrir alteraciones en su tamaño, lo que permite llevar a cabo procesos en “*batch*”. Otro aspecto importante es la estabilidad de la sílica a alta presión que permite su uso en HPLC.
- ✓ **Estabilidad química y biológica.** La sílica no es susceptible de sufrir degradaciones por la acción de microorganismos y agentes químicos.
- ✓ **Estabilidad térmica.** Es posible utilizar un amplio rango de temperaturas sin que la sílica sufra descomposiciones térmicas y puede ser usada en procesos asistidos con microondas.
- ✓ **Independencia del disolvente.** La sílica no sufre ni encogimiento ni hinchado como consecuencia de la acción de los disolventes. Además, no es soluble en ningún disolvente, lo que facilita la operatividad.

Capítulo 4

- ✓ **Facilidad de uso** en lo que respecta, fundamentalmente, al **manejo y pesado**.
- ✓ **Flexibilidad de formatos**. Es posible preparar fácilmente sílicas funcionalizadas con un amplio rango de tamaños de partícula. Al no sufrir hinchamiento en contacto con disolventes estos materiales pueden ser empaquetados en una variedad de formatos tales como columnas de HPLC, cartuchos flash.
- ✓ **Reproducibilidad**. Permiten cargas de material exactas incrementando el grado de reproducibilidad en sus aplicaciones.

El uso de la sílica como soporte para la inmovilización de macromoléculas cobra creciente interés y existe en el mercado ConA soportada covalentemente sobre sílica (Biotech Support Group) que interacciona con carbohidratos, sílica con ácidos grasos (Nimbus Biotechnology) para incorporación de proteínas de membrana y sílica con albúmina sérica humana (Nimbus Biotechnology). Las estrategias que se utilizan para la inmovilización de biomoléculas sobre sílica son las mismas que las utilizadas para otros soportes:

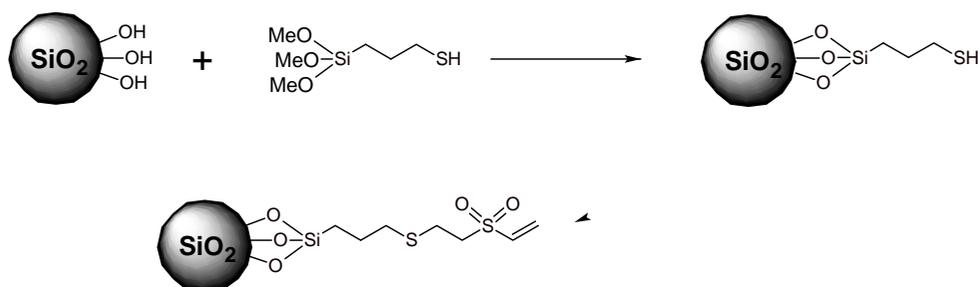
- ✓ Fusión de la proteína a colas o dominios proteicos que le confieren afinidad por el soporte. Para proteínas con colas de histidina existe HisLink Resin de Promega y sílica con Ni de Biotech Support Group, con GST existe en el mercado sílica con glutatión de Biotech Support Group, proteínas con péptidos que interaccionan con estreptavidina pueden inmovilizarse sobre sílicas con estreptavidina de Bangs Laboratories y de Polysciences e incluso existen péptidos capaces de interaccionar directamente con la sílica (Arg-Tag14, Si-Tag15)
- ✓ Funcionalización de la sílica para su activación y reacción con la macromolécula (**tabla 4.3.**)

Compañía	Funcionalización
Biotech Support Group	Epoxi, amina, aldehído, glicol, azido, carboxi, N-hidroxi-succinimida, ácido fenilborónico
Polysciences	Carboxilo, amino,
Bangs Laboratories	Carboxi, amino
Sigma-Aldrich	Numerosas funcionalizaciones como “scavenger”, algunas de las cuales, como la tiol-sílica o la maleimido propil sílice, tienen aplicación en la inmovilización de macromoléculas

Tabla 4.3. Algunas compañías que comercializan soportes basados en sílica y funcionalización de estos soportes.

La variabilidad de grupos orgánicos que aparecen unidos a la sílica en compuestos comerciales es amplia, como se muestra en la **tabla 4.3**. Sin embargo, hasta el presente no se ha descrito la funcionalización de sílica con grupos vinilsulfona, función altamente reactiva en procesos de adición tipo Michael, con atractivo potencial biotecnológico.

La funcionalización química de la sílica se llevó a cabo mediante la silanización de la sílica activada. Así, se incorporó la función vinilsulfona vía reacción de la sílica con 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS) para introducir grupos tiol que en una posterior etapa se hicieron reaccionar con DVS, tal y como se muestra en el **esquema 4.1**.



Esquema 4.1. Obtención de sílica funcionalizada con grupos vinilsulfona.

Para la obtención de la sílica conteniendo grupos tiol se utilizaron dos metodologías diferentes. La primera de estas estrategias es la empleada por Airoidi y col.⁴⁶³ para la obtención de mercapto-sílica y en ella la sílica activada se trata con MPTS en xileno a reflujo y bajo atmósfera de Ar durante 72 horas. La segunda metodología fue empleada por Venturello y col.⁴⁶⁴ para la incorporación de grupos amino a la estructura de la sílica. En este segundo caso la reacción se lleva a cabo en tolueno a reflujo durante 2 horas, también bajo atmósfera de Ar. A continuación se evapora parte del disolvente, para eliminar el MeOH que se ha generado en la reacción, y se vuelve a calentar a reflujo dos horas más. Una vez finalizada la reacción la sílica se filtró y se lavó con xileno o tolueno, según el caso, MeOH y acetona y se secó en la estufa a vacío y a 50°C durante al menos una noche. Se llevó a cabo un análisis elemental de los materiales obtenidos para determinar la cantidad de grupos tiol incorporados. En el caso de la sílica obtenida en xileno (**sílica-X**) la carga es de ~1 mmol/g y para la obtenida utilizando tolueno (**sílica-T**) es de ~0.8 mmol/g.

Para la funcionalización de estos materiales con grupos vinilsulfona se llevó a cabo la reacción con un exceso de DVS y una cantidad catalítica de Et₃N. Como disolvente se empleó THF:isopropanol (1:2)²⁷¹ al cual previamente se le burbujeó Ar durante al menos 5 minutos. Aunque las reacciones de DVS con grupos tiol son muy rápidas, en este caso se trata de una reacción en fase heterogénea y no es posible saber cuando finaliza, por lo que la suspensión se mantuvo bajo agitación magnética a t.a. durante una noche.

4.3.2. Inmovilización de invertasa y lisozima sobre sílica-vinilsulfona (X-VS y T-VS).

Para evaluar la potencialidad de estos materiales para la inmovilización de proteínas se llevaron a cabo estudios con dos proteínas modelo: la lisozima y la invertasa. La **lisozima**, como se comentó en el **capítulo 2**, es una proteína de pl

463.Vieira, E. F. S.; Cestari, A. R.; Simoni, J. D.; Airoidi, C., Thermochemical data for interaction of some primary amines with complexed mercury on mercapto-modified silica gel. *Thermochimica Acta* **2003**, 399, (1-2), 121-126.

464.Angeletti, E.; Canepa, C.; Martinetti, G.; Venturello, P., Amino-groups immobilized on silica-gel - an efficient and reusable heterogeneous catalyst for the knoevenagel condensation. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1989**, (1), 105-107.

básico y bajo peso molecular (14kDa) y la **invertasa** es una glicoproteína con actividad enzimática que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa.

Se preparó una disolución de invertasa de 1.5 mg/mL en tampón HEPES 0.1M pH 8 y se adicionaron 10 mL de esta disolución a 500 mg de cada una de las sílicas (**X-VS** y **T-VS**) y a un control de sílica sin modificar. Las suspensiones resultantes se mantuvieron bajo agitación orbital a 120 rpm y cada cierto tiempo se midió la concentración de proteína en solución. Tras 24 horas las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con agua (2x10 mL), para eliminar el exceso de proteína que no quedó unida covalentemente, y con una disolución de NaCl 2M (4x10 mL) para analizar la existencia de interacciones de naturaleza electrostática entre el material y la proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 4.6.** y la **tabla 4.4.**

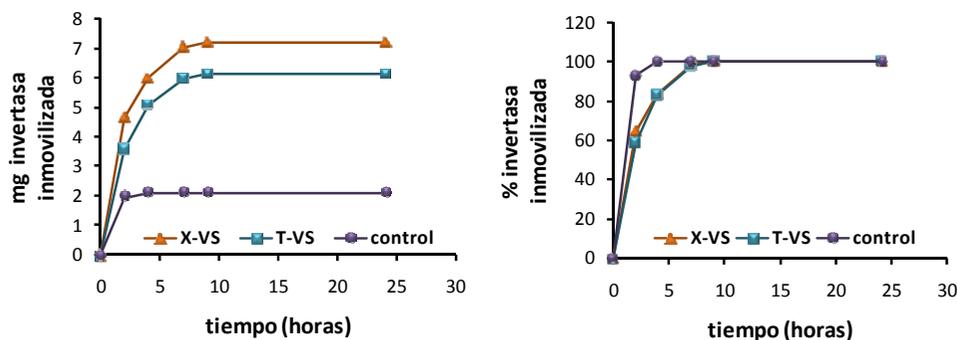


Figura 4.6. Representación gráfica de la cantidad de invertasa inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

MATERIAL	Invertasa inmovilizada	Invertasa inmovilizada
	mg	mg/g
X-VS	6.21	12.42
T-VS	5.04	10.08
control	1.05	2.1

Tabla 4.4. Capacidad de inmovilización para los diferentes materiales ensayados.

En relación a la velocidad de inmovilización la sílica sin funcionalizar presenta el comportamiento típico de una absorción de tipo físico, caracterizada porque en cortos periodos de tiempo (<1 hora) se alcanza el plató (**figura 4.6.**). Sin embargo, para **X-VS** y **T-VS** la cantidad de proteína inmovilizada va aumentando con del tiempo, alcanzándose el plató a las 7 horas de reacción, aproximadamente.

Capítulo 4

Para los dos nuevos materiales (**X-VS** y **T-VS**) no se observan diferencias significativas entre los lavados realizados con H₂O y los realizados con NaCl, lo que indica la ausencia de interacciones electrostáticas entre ellos y la invertasa. La cantidad total de proteína inmovilizada sigue el patrón **X-VS>T-VS>control**. Tal y como se indicó, la funcionalización con SH es menor para **T-VS** que para **X-VS**, lo cual está de acuerdo con la capacidad que estos soportes presentan para la inmovilización de invertasa (**X-VS>T-VS**).

La inmovilización covalente de enzimas puede provocar la pérdida de actividad como consecuencia de la participación en la inmovilización de grupos implicados en la actividad biológica. Para analizar si estos materiales son capaces no sólo de inmovilizar sino de ser compatibles con la actividad enzimática se midió la actividad de la invertasa inmovilizada. Se preparó una disolución de sacarosa al 1% en tampón fosfato 10 mM pH 7.4 NaCl 100 mM y se añadieron 10 mL de esta disolución a las muestras de **X-VS** y **T-VS**. Cada cierto tiempo se midió el poder rotatorio de la disolución y se llevó a cabo una representación del mismo en función del tiempo (**figura 4.7.**)

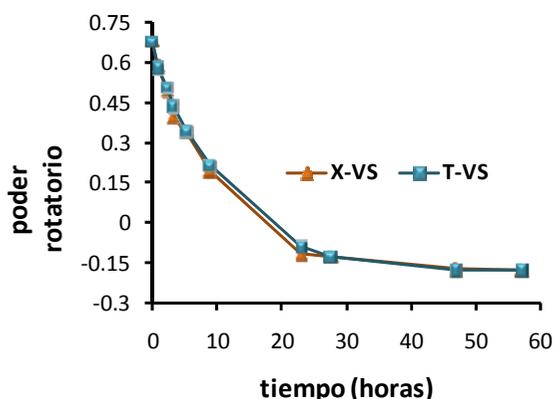


Figura 4.7. Representación del poder rotatorio en función del tiempo de una disolución de sacarosa al 1% en contacto con invertasa inmovilizada sobre **X-VS** y **T-VS**.

Como se muestra en la **figura 4.7.**, la invertasa inmovilizada es activa y, además, en ambos casos la actividad es del mismo orden, lo que está de acuerdo con la cantidad de proteína inmovilizada, muy similar para ambos materiales.

Se repitió el ensayo de inmovilización variando la naturaleza del tampón y el pH para estudiar su influencia sobre la cantidad de invertasa inmovilizada. Se

repitió el experimento anterior empleando tampón fosfato 0.1M pH 8.5 y los resultados obtenidos se recogen en la **tabla 4.5**.

MATERIAL	Invertas inmovilizada	Invertasa inmovilizada
	mg	mg/g
X-VS	5.95	11.90
T-VS	4.92	9.84

Tabla 4.5. Capacidad de inmovilización para los diferentes materiales ensayados.

Estos resultados no difieren significativamente de los obtenidos en el ensayo anterior, poniendo de manifiesto que la naturaleza del tampón no afecta al rendimiento de inmovilización y, además, que éste es bastante reproducible.

Para llevar a cabo el estudio de inmovilización de la segunda proteína modelo, la lisozima, se siguió el mismo esquema de trabajo. Se preparó una disolución de lisozima de 1.5 mg/mL en tampón fosfato 0.1M pH 8.5 y se adicionaron 10 mL de esta disolución a 500 mg de cada uno de los materiales, **X-VS** y **T-VS**, y a 500 mg de sílica sin modificar. Las suspensiones resultantes se mantuvieron bajo agitación orbital a 120 rpm durante 24 horas y cada cierto tiempo se midió la concentración de proteína en solución. De nuevo, tras 24 horas de reacción las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con agua (2x10 mL) y con una disolución de NaCl 2M x4 (10 mL). Los resultados obtenidos se muestran en la **figuras 4.8.** y **4.9.** y la **tabla 4.6**.

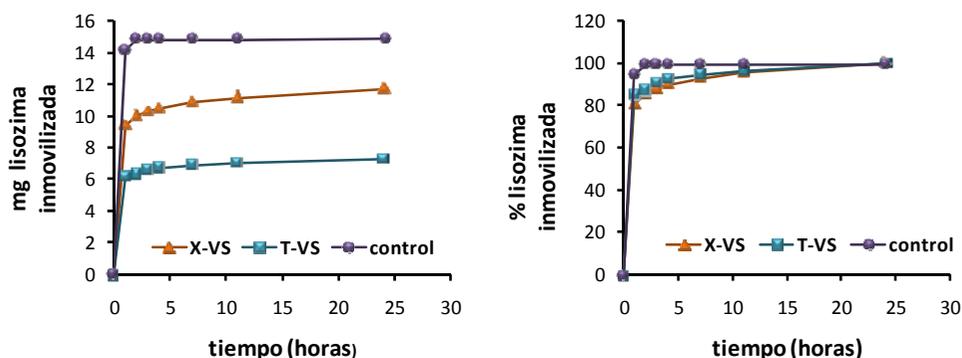


Figura 4.8. Representación gráfica de la cantidad de lisozima inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

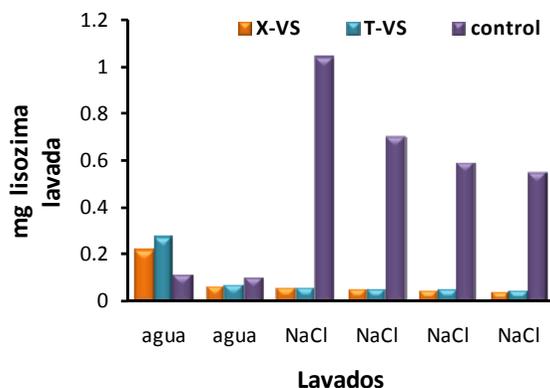


Figura 4.9. Representación de los mg de proteína retirados en cada uno de los lavados para los soportes X-VS y T-VS y para la sílica sinfuncionalizar.

MATERIAL	Lisozima inmovilizada	Lisozima inmovilizada
	mg	mg/g
X-VS	11.26	22.52
T-VS	6.77	13.54
control	11.83	23.66

Tabla 4.6. Capacidad de inmovilización para los diferentes materiales ensayados.

En lo que respecta a la velocidad de inmovilización la sílica vuelve a presentar el comportamiento típico de una adsorción física y para X-VS y T-VS el proceso de inmovilización es algo más rápido que en el caso de la invertasa ya que prácticamente en 4 horas se ha alcanzado el plató (figura 4.8.). En este caso el material capaz de retener la mayor cantidad de proteína es la sílica sin modificar y esta capacidad se debe a la absorción de la proteína sobre la sílica⁴⁶⁵⁻⁴⁶⁷. Para la lisozima se produce una acusada pérdida de proteína al lavar con NaCl lo cual revela la existencia de interacciones electrostáticas. Al igual que en el caso de la invertasa la cantidad de lisozima inmovilizada para X-VS>T-VS, lo cual está de acuerdo con el grado de funcionalización de estos materiales, aunque para esta

465.Kondo, A.; Murakami, F.; Kawagoe, M.; Higashitani, K., Kinetic and circular dichroism studies of enzymes adsorbed on ultrafine silica particles. *Appl Microbiol Biotechnol* **1993**, 39, (6), 726-31.

466.Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B.-H., Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir* **2004**, 20, (24), 10639-10647.

467.Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S., Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* **2004**, 20, (16), 6800-6807.

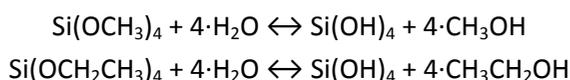
proteína la diferencia es más acusada. A diferencia de lo que ocurre con la sílica sin modificar, para estos materiales no se establecen interacciones de naturaleza electrostática con la proteína (**figura 4.9.**).

4.3.3. Funcionalización del gel de sílice con grupos vinilsulfona. Aplicación en inmovilización covalente de proteínas.

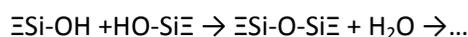
Debido a los buenos resultados obtenidos con las sílicas **T-VS** y **X-VS** se planteó la posibilidad de obtener un soporte cromatográfico continuo funcionalizado también con grupos vinilsulfona. A tal objeto se seleccionó como material los geles de sílice ya que es posible la incorporación de grupos orgánicos dando lugar a lo que se conoce como ORMOSILS⁴⁶⁸ (“*organically-modified silicas*”).

Los **geles de sílice** son una forma parcialmente hidratada de óxido de silicio (SiO₂), de estructura amorfa y elevada porosidad. Se obtienen a través de lo que se conoce como **proceso sol-gel** en el que partiendo de una suspensión coloidal de partículas sólidas o cúmulos en un líquido (sol), mediante hidrólisis y condensación se forma un material sólido lleno de solvente (gel). En las etapas de hidrólisis y condensación los procesos que tienen lugar son:

- ✓ **Hidrólisis:** conduce a la formación de ácido silícico empleando como precursores, el tetrametoxisilano (TMOS, tetrametil ortosilicato) o el tetraetoxisilano (TEOS, tetraetil ortosilicato), entre otros. La reacción global se puede expresar de la siguiente manera:



- ✓ **Condensación:** el ácido silícico condensa para dar lugar al gel.



⁴⁶⁸Tripathi, V. S.; Kandimalla, V. B.; Ju, H., Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules. *Sens. Actuators, B* **2006**, B114, (2), 1071-1082.

Capítulo 4

Ésta es una descripción muy simplificada del proceso de polimerización de los geles de sílice, pues aunque el proceso de sol-gel no es nuevo, todavía se desconocen la totalidad de los mecanismos involucrados, los cuales influyen en la estructura y propiedades de los materiales que se obtienen⁴⁶⁹.

De los ortosilicatos empleados para generar estos geles se eligió el **TMOS** porque los **tiempos de homogeneizado** y los de **gelificación** se reducen con respecto al TEOS. Para poder incorporar los grupos vinilsulfona al gel se planteó la polimerización de TMOS en presencia de **MPTS**⁴⁷⁰ para, al igual que en la metodología anterior, tener grupos tiol capaces de reaccionar con DVS y generar grupos vinilsulfona libres.

La velocidad de gelificación depende del **pH del medio**. A valores cercanos al pH neutro el **tiempo de gelificación** se reduce mientras que a valores de pH ácido o básico el tiempo de gelificación aumenta considerablemente. Dado que el objetivo era llevar a cabo la reacción del grupo tiol del MPTS con la DVS en el mismo medio de gelificación fue necesario utilizar un medio básico. Se optó por un pH de 8.5 ya que en estas condiciones la gelificación es lo suficientemente lenta para que se produzca en primer lugar la reacción entre la DVS y el tiol del MPTS. Para fijar el pH se trabajó con tampón HEPES 100 mM.

Ni el MPTS ni la DVS son suficientemente solubles en agua de manera que la formación del gel se llevó a cabo en un medio hidroalcohólico. Se empleó MeOH: tampón (3:1), ya que en una serie de ensayos previos estas condiciones fueron las que mejores resultados proporcionaron.

Al objeto de realizar una serie de estudios previos se prepararon 6 geles cuya composición se resume en la **tabla 4.7**.

⁴⁶⁹.Brinker, C. J., Sol-gel processing of silica. *Surfactant Sci. Ser.* **2006**, 131, (Colloidal Silica), 615-636.

⁴⁷⁰.Mansur, H. S.; Vasconcelos, W. L.; Lenza, R. F. S.; Orefice, R. L.; Reis, E. F.; Lobato, Z. P., Sol-gel silica based networks with controlled chemical properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2000**, 273, (1-3), 109-115.

	% MPTS	%TMOS	%SOL	MPTS/TMOS(v/v)
Gel 1	0	10.3	10.3	0
Gel 2	5.28	4.06	9.35	1.30
Gel 3	7.23	3.91	11.15	1.85
Gel 4	8.61	3.80	12.41	2.26
Gel 5	9.91	3.69	13.60	2.68
Gel 6	7.34	2.74	10.0	2.68

Tabla 4.7. Composición y estequiometría MPTS/TMOS de los geles preparados.

El **gel 1** es un gel control para asegurar que en estas condiciones tiene lugar la gelificación. Los **geles 2-5** contienen prácticamente el mismo porcentaje de TMOS y la proporción MPTS/TMOS va aumentando dentro de la serie. Para el **gel 6** la proporción MPTS/TMOS es la misma que la utilizada para el **gel 5** pero el porcentaje total de gel (% sol) disminuye. En todos los casos se trabaja con un exceso de DVS, más concretamente 1.5 moles por cada mol de MPTS, por lo que la DVS no supone un factor limitante en el grado de funcionalización del gel.

Se prepararon réplicas de cada uno de estos geles que permitieron analizar distintos factores como el tiempo de envejecimiento o los lavados. Los resultados indican:

- ✓ Son suficientes 3-4 minutos de **agitación** para homogeneizar la muestra. Tiempos prolongados de agitación ($t > 30$ minutos) repercuten negativamente en la gelificación.
- ✓ **El tiempo de envejecimiento** es un factor de gran importancia. Aunque tras una noche el gel parece estar formado, al lavar se rompe y pierde su forma original, llegándose a crear unas grietas a modo de canales que comprometen su integridad. A partir de 2-3 días aumenta la estabilidad de los mismos.
- ✓ Con respecto al protocolo de **lavado** es mejor llevar a cabo un primer lavado con MeOH y después con H₂O.
- ✓ Para el flujo a través del gel empleando una bomba peristáltica para hacer circular la solución se observa la siguiente tendencia: **6 > 5 > 4 > 3 > 2 ~ 1**, de hecho **2** y **1** presentan un flujo prácticamente nulo en las condiciones en las que se trabajó. Así pues, al disminuir la proporción MPTS/TMOS, para un porcentaje de TMOS similar, el gel que se obtiene

Capítulo 4

es más denso y presenta un flujo menor. Para la misma proporción MPTS/TMOS (**geles 5 y 6**) al disminuir el porcentaje del gel se observa una ligera mejoría en el flujo.

Dado que se persigue la obtención de un soporte cromatográfico continuo y el **gel 6** fue el que proporcionó las mejores propiedades de flujo se abordaron los estudios de inmovilización con este gel. Además, manteniendo fija la cantidad de TMOS se prepararon dos geles en los que se varió la proporción MPTS/TMOS para estudiar su influencia sobre la capacidad de inmovilización de los geles.

	% MPTS	% SOL	MPTS/TMOS(v/v)
Gel 6↓	3.92	6.85	1.34
Gel 6	7.33	10.06	2.68
Gel 6↑	12.96	15.38	5.35

Tabla 4.8. Composición y estequiometría MPTS/TMOS de los geles preparados.

Tras una noche, todos gelificaron y se mantuvieron otros 7-9 días envejeciendo. En la **figura 4.10.** se muestra el aspecto que presentan los geles una vez formados.



Figura 4.10. Imagen del aspecto de los geles una vez han gelificado.

En todos los casos, tras el lavado con MeOH y H₂O, se produce una reducción de volumen, siendo más acusada en el caso del **gel 6↑**. Con respecto al flujo, se observa la misma tendencia que en los geles anteriores, es decir, al aumentar la proporción de MPST/TMOS aumenta el flujo (**6↑>6>6↓**). Estos dos hechos ponen de manifiesto que al aumentar la proporción MPTS/TMOS el gel que se forma es menos denso.

	6↓	6	6↑
V antes del lavado mL	4	4.4	4.6
V tras el lavado mL	2.5	2.2	1.4

Tabla 4.9. Volúmenes de los geles antes y después de ser lavados.

Al objeto de evaluar la potencialidad de los geles obtenidos para la inmovilización de biomoléculas se llevaron a cabo estudios con las mismas proteínas modelo utilizadas en el caso anterior, es decir, lisozima e invertasa. En ambos casos se prepararon disoluciones de proteína de 1 mg/mL en tampón fosfato 100 mM pH 8.5 y se adicionaron 12 mL de esta disolución a cada uno de los geles. Las disoluciones se agitaron en un agitador orbital a una velocidad de 50 rpm y cada cierto tiempo se midió la concentración de proteína en solución. Una vez alcanzado el plató los geles se lavaron con H₂O, para eliminar la proteína no unida covalentemente, y, además, se llevaron a cabo varios lavados con NaCl 2M para retirar la proteína adsorbida físicamente a través de interacciones electrostáticas. Los resultados obtenidos se resumen en la **figura 4.11.** y en la **tabla 4.10.**

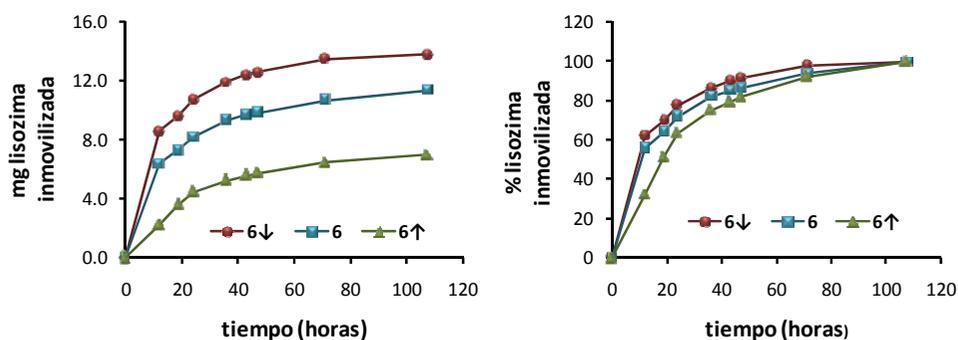


Figura 4.11. Representación gráfica de la cantidad de lisozima inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

	Lisozima mg en gel	Invertasa mg en gel	MPTS/TMOS(v/v)
Gel 6↓	13.65 (5.46)	5.45(2.18)	1.34
Gel 6	11.21(5.09)	5.17 (2.35)	2.68
Gel 6↑	6.54(4.67)	0.57(0.41)	5.35

Tabla 4.10. Capacidades de inmovilización para los diferentes geles (mg de proteína / mL de gel) y estequiometría MPTS/TMOS de los mismos.

Capítulo 4

Para la invertasa los datos no han sido representados, pero la tendencia que se observa es la misma que para la lisozima. A diferencia de los soportes obtenidos en el apartado anterior (**X-VS** y **T-VS**) en este caso el proceso de inmovilización es bastante más lento ya que se requiere del orden de 2 a 3 días de reacción para que se alcance el 90% de inmovilización. En ninguno de los geles se observan diferencias significativas entre los lavados llevados a cabo con H₂O y con NaCl lo que indica la ausencia de absorción física de proteína en estos materiales debida a interacciones electrostáticas. En lo que respecta a la cantidad de proteína inmovilizada se observa que para todos los geles la cantidad de lisozima inmovilizada es superior a la de invertasa. Además, un aumento en la proporción MPTS/TMOS no implica un aumento en la capacidad de inmovilización, ya que para ambas proteínas la cantidad total de proteína inmovilizada disminuye al aumentar esta proporción, siendo esta disminución más acusada para la invertasa pues el **gel 6↑** apenas retiene proteína. Cuando esta capacidad se expresa en mg de proteína por mL de gel la capacidad de los **geles 6 y 6↓** es muy parecida. Aunque no se llevó a cabo un análisis cuantitativo riguroso de la actividad de invertasa inmovilizada los resultados indican que ésta sigue siendo activa.

Para estudiar como se ven afectadas las propiedades de los geles y su capacidad para la inmovilización de proteínas se prepararon nuevos geles manteniendo constantes las proporciones MPTS/TMOS y reduciendo a la mitad el porcentaje de sol. Además, para comprobar la reproducibilidad de los geles y para tener una referencia se incluyó de nuevo en este estudio el **gel 6**. Tras 7-9 días de maduración los geles se lavaron con MeOH y H₂O

	% MPTS	% SOL	MPTS/TMOS(v/v)
GEL 6	3.92	10.06	2.68
GEL 7↓	2.06	3.6	1.34
GEL 7	3.98	5.46	2.68
GEL 7↑	7.43	8.81	5.35

Tabla 4.11. Composición y estequiometría MPTS/TMOS de los geles preparados.

	7↓	7	7↑
V antes del lavado mL	3.8	4	4.2
V tras el lavado mL	2	1.7	1

Tabla 4.12. Volúmenes de los geles antes y después de ser lavados.

De nuevo, en todos los casos se produce una reducción de volumen, siendo superior a la observada para los geles anteriores, en los que el porcentaje de sol es el doble. De hecho, en el caso del **gel 7↑** el gel es muy poco denso y pierde totalmente la forma. En lo referente al flujo la tendencia es la misma que la observada hasta el momento, es decir, el flujo aumenta al aumentar la proporción de MPST/TMOS y con respecto a los geles anteriores se observa una ligera mejoría en este aspecto.

Se llevaron a cabo estudios de inmovilización con lisozima e invertasa. Se prepara una solución de proteína de 1 mg/mL en tampón fosfato 100 mM pH 8.5 y se adicionan 12 mL de esta disolución a cada uno de los geles. Una vez alcanzado el plató los geles se lavaron con H₂O y NaCl 2M. Los resultados obtenidos se resumen en la **figura 4.12.** y **4.13.** y en la **tabla 4.13.**

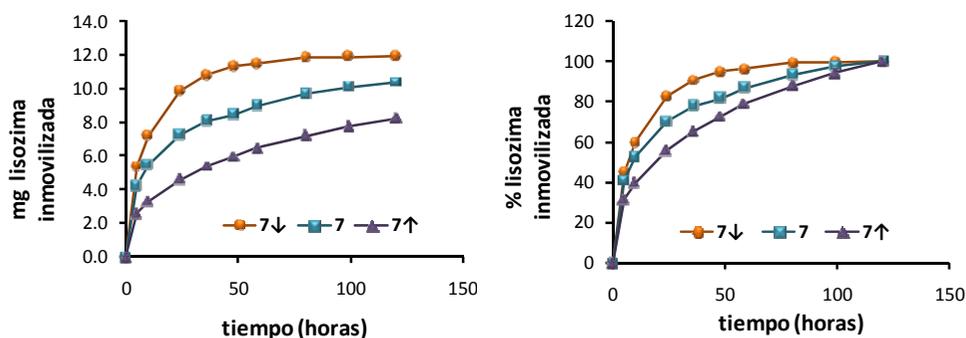


Figura 4.12. Representación gráfica de la cantidad de lisozima inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

Capítulo 4

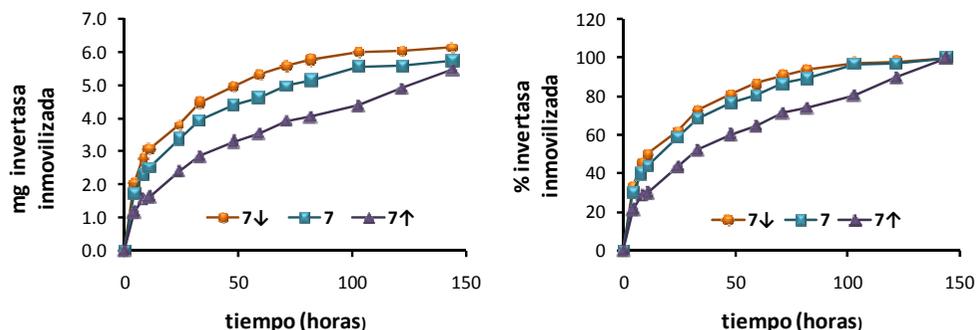


Figura 4.13. Representación gráfica de la cantidad de invertasa inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

Tabla 4.13. Capacidades de inmovilización para los diferentes geles (mg de proteína/mL de gel),

	Lisozima mg en gel	Invertasa mg en gel	MPTS/TMOS(v/v)	% SOL
Gel 6	10.28(4.67)	5.12(2.33)	2.68	10.06
Gel 7↓	11.90(5.95)	5.24(2.62)	1.34	3.6
Gel 7	8.01(4.71)	4.43(2.69)	2.68	5.46

estequiometría MPTS/TMOS y porcentaje de sol de los mismos.

Para el gel **7↑** no se recogen los resultados obtenidos ya que prácticamente no inmoviliza proteína. Los resultados indican:

- ✓ El proceso de inmovilización es lento. Se necesitan de 2 a 3 días de reacción para alcanzar el plató.
- ✓ No existen diferencias entre los lavados realizados con H₂O y NaCl, por lo que las proteínas no quedan retenidas en el gel por cargas electrostáticas.
- ✓ Para el **gel 6** los resultados que se obtienen son comparables a los obtenidos en los ensayos anteriores lo cual demuestra la reproducibilidad de los geles.
- ✓ Al igual que en la serie anterior, al aumentar la proporción MPTS/TMOS se produce una disminución en la cantidad de proteína inmovilizada. De hecho, una proporción MPTS/TMOS elevada (**gel 7↑**) repercute negativamente.
- ✓ Al disminuir el porcentaje de sol del gel (**geles 6 y 7 o geles 6↓ y 7↓**) disminuye la cantidad total de proteína inmovilizada. Sin embargo si se

expresa esta capacidad en mg de proteína por mL de gel apenas se observan diferencias.

De los diferentes geles sintetizados los que reúnen mejores propiedades de flujo y consistencia y una buena capacidad para la inmovilización de proteínas son los **geles 6 y 7** (MPTS/TEMOS=2.68). Con estos geles se llevó a cabo la inmovilización de ferritina con el fin de poder visualizar la distribución de la proteína en el gel. La ferritina es una proteína almacenadora de hierro y debido a la presencia de éste tiene un color oscuro, perfectamente visible y, además, al ser la única fuente de Fe en la muestra, por microanálisis es posible establecer su distribución en la misma.

Para la inmovilización de ferritina se siguió el mismo protocolo que en los casos anteriores y los ensayos se realizaron por duplicado para comprobar la reproducibilidad de los mismos. Los resultados ser recogen en la **figura 4.14.** y la **tabla 4.14.**

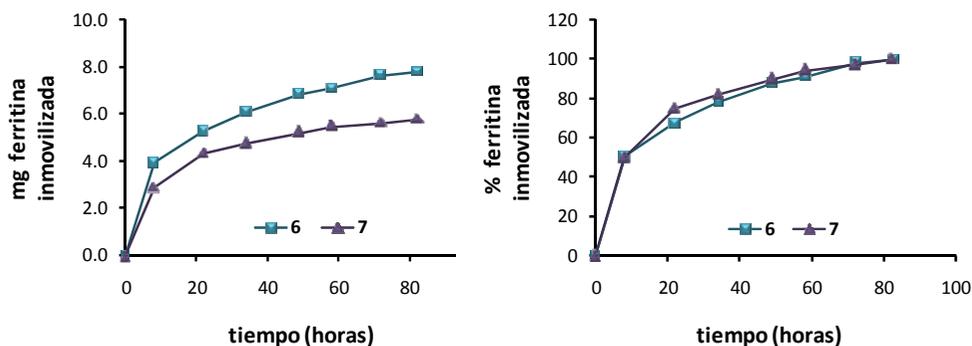


Figura 4.14. Representación gráfica de la cantidad de ferritina inmovilizada en función del tiempo (izquierda) y evolución del porcentaje inmovilizado en función del tiempo (derecha).

	Ensayo 1	Ensayo 2	MPTS/TMOS(v/v)	% SOL
	mg ferritina en gel			
Gel 6	6.87(3.12)	7.49(3.40)	2.68	10.06
Gel 7	4.84(2.85)	5.21(3.06)	2.68	5.46

Tabla 4.14. Capacidades de inmovilización para los diferentes geles (mg de proteína/mL de gel), estequiometría MPTS/TMOS y porcentaje de sol de los mismos.

Estos valores vuelven a poner de manifiesto la reproducibilidad de los geles. De nuevo, para una misma proporción MPTS/TEMOS la cantidad de proteína

Capítulo 4

inmovilizada disminuye al disminuir el porcentaje de sol del gel, aunque cuando esta capacidad se expresa en mg de proteína por mL de gel las diferencias son menos acusadas.

Como se ha comentado, la ferritina tiene color por lo que al partir los geles se observó que éste sólo se encontraba en la superficie del mismo, apenas había penetrado hacia el interior del gel, tal y como se muestra en la **figura 4.15**.

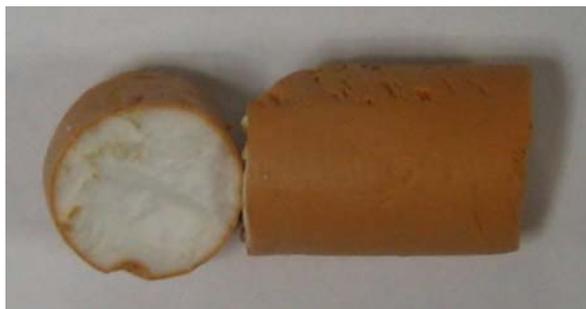
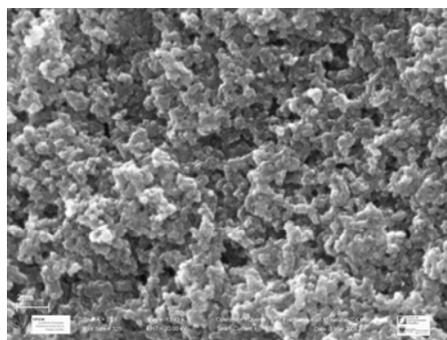
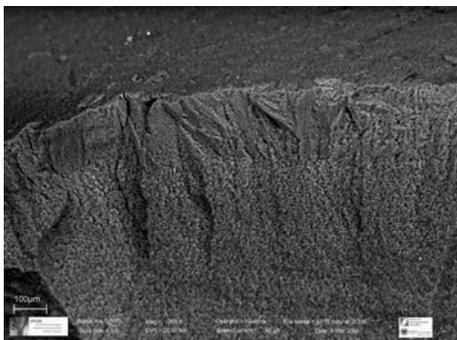


Figura 4.15. Imagen de uno de los geles donde se ha llevado a cabo la inmovilización de ferritina.

Para establecer exactamente la penetración de la ferritina en el interior del gel se llevó a cabo un microanálisis por energía dispersiva de RX (EDS). Mediante este estudio de distribución de Fe en el gel se pudo establecer que la penetración de la ferritina en el **gel 6** es $200\mu\text{m}$, como muestra la **figura 4.17**.



Figuras 4.16. Imágenes de los geles de sílice funcionalizados con vinilsulfona obtenidas por SEM. Izquierda 269x y derecha 13420x.

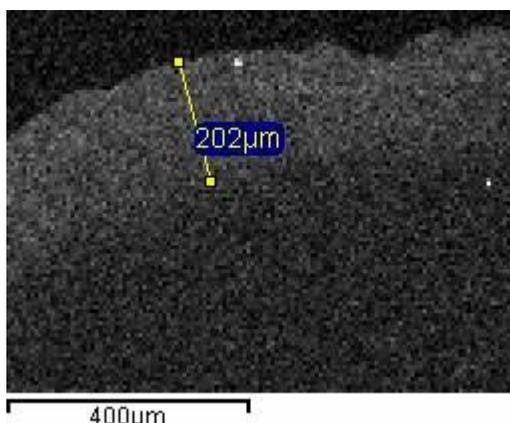


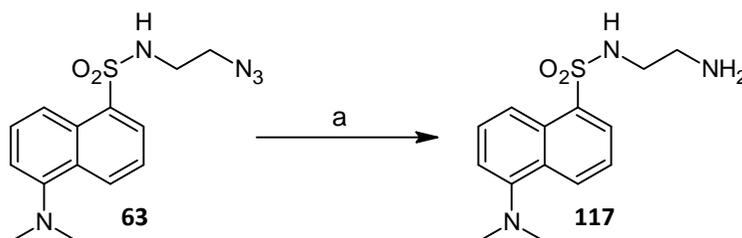
Figura 4.17. Mapa de distribución de Fe obtenido mediante EDS.

Para comprobar que este resultado era consecuencia de la dificultad de difusión de la proteína a través del gel y no de la falta de funcionalización en el interior del mismo se llevó a cabo un ensayo utilizando el amino-dansilo derivado.

Y. Esta molécula reúne una serie de características interesantes para este estudio:

- ✓ Tiene un **tamaño pequeño**, por lo que su difusión hacia el interior del gel no está limitada
- ✓ Contiene un **grupo amino** que es capaz de reaccionar con vinilsulfonas.
- ✓ Tiene **propiedades fluorescentes** lo cual nos va a permitir su visualización.

Su síntesis se llevó a cabo a partir del azido derivado **63** por reducción mediante hidrogenación (**esquema 4.2**)



Esquema 4.2. Condiciones: (a) MeOH activado, Pd (C), 91%.

Para llevar a cabo la inmovilización de esta nueva molécula en los geles se preparó una disolución de **117** de 1 mg/mL y se adicionaron 12 mL de esta disolución a cada uno de los geles. A medida que se fue consumiendo el dansilo en

Capítulo 4

solución se llevaron a cabo adiciones de una disolución concentrada de 10 mg/mL. En total se adicionaron 20 mg de dansilo a cada uno de los geles (**6 y 7**). Tras lavarlos extensamente con H₂O y con NaCl 2M para eliminar el dansilo que no ha quedado unido covalentemente se tomaron imágenes de los geles mediante Microscopía Láser Confocal (CLSM) (**figura 4.18**).

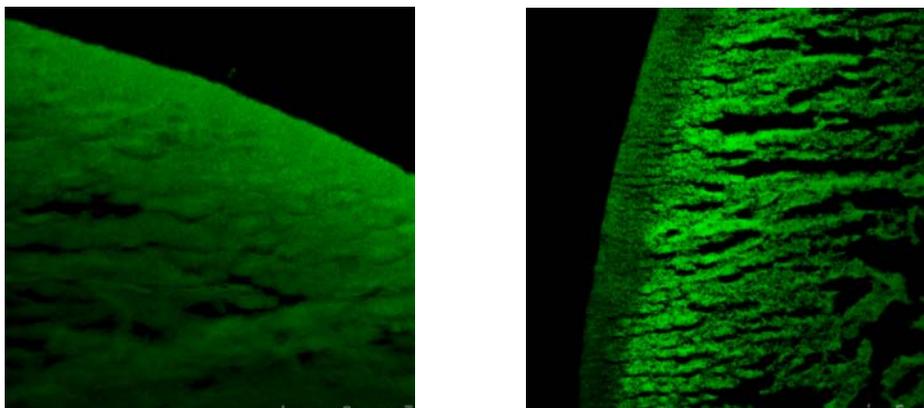


Figura 4.18. Imágenes de los geles tratados con el compuesto **117** obtenidas mediante microscopía de láser confocal. Izquierda **gel 6** 20x y derecha **gel 7** 10x.

En ambos geles (**6 y 7**) el dansilo es capaz de penetrar hasta el interior de los mismos, por lo que el resultado observado en el caso de la ferritina es una consecuencia de la baja difusión de la proteína a través del gel y no de la funcionalización del mismo.

4.4 Conclusiones.

Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficiente para la funcionalización de la sílica y geles de sílice con grupos vinilsulfona y se ha puesto de manifiesto su capacidad para la inmovilización de proteínas modelo (invertasa y lisozima).

Las sílicas **X-VS** y **T-VS** presentan excelentes capacidades de inmovilización tanto para lisozima como para la invertasa, siendo esta capacidad superior en el caso de **X-VS**. El proceso de inmovilización en estos materiales tiene lugar en cortos periodos de tiempo y se ha puesto de manifiesto la ausencia de interacciones electrostáticas entre estos soportes y las proteínas ensayadas, incluso para la lisozima, proteína con pl básico. Para la invertasa se ha comprobado que la proteína inmovilizada mantiene su actividad enzimática.

En los geles de sílice se ha puesto de manifiesto la importancia de la estequiometría MPTS/TMOS en diversos aspectos como las propiedades del gel (flujo y consistencia) y su capacidad para la inmovilización de proteínas. Así:

- ✓ Al aumentar la proporción MPTS/TMOS se mejora el flujo del gel y se observa una mayor reducción en el volumen del mismo tras los lavados (geles menos densos).
- ✓ Un aumento en la proporción MPTS/TMOS no implica un aumento en la capacidad para la inmovilización de proteínas del gel sino todo lo contrario.

Al disminuir el porcentaje de sol a la mitad se observa una ligera mejoría en el flujo de los mismos y una mayor reducción de volumen. En lo que respecta a la capacidad de inmovilización al disminuir el porcentaje de sol disminuye la cantidad total de proteína sin embargo, a penas se observan diferencias si esta capacidad se expresa en mg de proteína/mL de gel.

Los ensayos llevados a cabo con ferritina y **117** han puesto de manifiesto que la capacidad de los geles sintetizados viene condicionada por la difusión de proteína a través del gel y no por la funcionalización del mismo. Este hecho también explica que se requieran largos tiempos de reacción para la inmovilización en comparación con **X-VS** y **T-VS**.

4.5. Sección experimental.

Activación de la sílica.

La sílica comercial (Merck, 70-230 mesh ASTM) se activó calentándola a 120°C y a vacío durante 24 horas⁴⁶⁴.

Procedimiento para la preparación de la sílica funcionalizada con grupos tiol.

Método A⁴⁶³: 10 gramos de sílica activada se suspendieron en xileno anhidro (40mL), al cual se le burbujeó previamente Ar, y se añadieron 7 mL de MPTS. La suspensión resultante se calentó a reflujo, bajo atmósfera de Ar, durante 72 horas. Se dejó que la disolución alcanzase la t.a. y a continuación se filtró, se lavó con xileno, metanol y acetona y se secó a vacío a 50°C durante al menos una noche. Se obtuvieron 11.830 gramos de sílica funcionalizada (**sílica-X**).

Metodo B⁴⁶⁴: 10 gramos de sílica activada se suspendieron en tolueno anhidro (40mL), al cual se le burbujeó previamente Ar, y se añadieron 7 mL de MPTS. La suspensión resultante se calentó a reflujo, bajo atmósfera de Ar, durante 2 horas. Se evaporó parte del disolvente, para eliminar el metanol formado, y se calentó de nuevo a reflujo durante 2 horas más. Se dejó que la disolución alcanzase la t.a. y a continuación se filtró, se lavó con tolueno, metanol y acetona y se secó a vacío a 50°C durante al menos una noche. Se obtuvieron 11.800 gramos de sílica funcionalizada (**sílica-T**).

Procedimiento para la preparación de la sílica funcionalizada con grupos vinilsulfona.

Para ambos materiales (**sílica-X** y **sílica-T**) se siguió el mismo procedimiento.

5 gramos de sílica, funcionalizada con grupos tiol, se suspendieron en 25mL de THF:isopropanol (1:2), a la cual se le burbujeó previamente Ar durante al menos 5 minutos. A la suspensión resultante se le añadieron 2.5 mL de DVS y 140µL de Et₃N y se mantuvo bajo agitación magnética a t.a. durante una noche. Se filtró, se lavó con acetona y éter y se secó a vacío a 50°C durante al menos una noche.

Inmovilización de proteína sobre X-VS y T-VS.

Para las distintas proteínas ensayadas, lisozima e invertasa, se prepararon disoluciones de las mismas en tampón fosfato 100 mM pH 8.5 a una concentración de 1.5 mg/mL. A 500 mg de cada una de las sílicas ensayadas (**X-VS**, **T-VS** y **control**) se le adicionaron 10 mL de cada una de estas disoluciones. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbitálica a 120rpm durante 24 horas y cada cierto tiempo se midió la concentración de proteína que quedaba en solución mediante absorción UV-Vis a 280nm. Tras 24 horas las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con H₂O (2x10 mL) y con NaCl 2M (4x10 mL).

Ensayo de actividad para la invertasa inmovilizada

Se preparó una disolución de sacarosa al 1% en tampón fosfato 10 mM pH 7.4 100 mM NaCl. Se adicionaron 10 mL de esta disolución a las **X-VS** y **T-VS** que contienen la invertasa inmovilizada. Cada cierto tiempo se mide el poder rotatorio de la disolución en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 a temperatura ambiente.

Procedimiento general para la síntesis de los geles de sílice.

Al MeOH y al tampón HEPES 100 mM pH 8.5 que se van a utilizar en la preparación de estos geles se les burbujeó Ar durante 10 min. En un matraz pequeño o en un vial provisto de un imán se adicionaron el MeOH, el MPST, la DVS, el TEMOS y por último el tampón HEPES 100 mM pH 8.5. La disolución resultante se agitó durante 3 minutos y se transvasó a una jeringa de 5mL, la cual se tapó con parafilm. Tras una noche el gel se formó y se dejó entre 7-9 días envejeciendo. Transcurrido este tiempo, y antes de llevar a cabo los ensayos de inmovilización de las proteínas, los geles se lavaron con 50mL de MeOH y 50mL de agua destilada.

	Gel 6↓	Gel 6	Gel 6↑	Gel 7↓	Gel 7	Gel 7↑
TMOS μL	130	130	130	65	65	65
MPST μL	174	348	696	87	174	348
DVS μL	136	272	544	68	136	272
MeOH mL	3	3	3	3	3	3
Tampón mL	1	1	1	1	1	1

Capítulo 4

Tabla 4.15. Volúmenes de TMOS, MPST, DVS, MeOH y tampón empleadas en la síntesis de los diferentes geles.

Las cantidades empleadas para la preparación de los geles utilizados en los estudios previos se recogen en la **tabla 4.16**.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
TMOS μL	230	94	94	94	94	65
MPST μL	0	122	174	213	252	174
DVS μL	0	94	136	166	197	136
MeOH mL	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Tampón mL	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Tabla 4.16. Volúmenes de TMOS, MPST, DVS, MeOH y tampón empleadas en la síntesis de los diferentes geles.

Inmovilización de proteína sobre los geles de sílice.

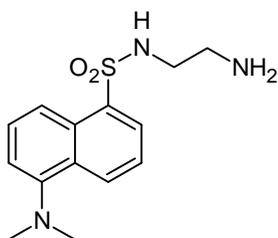
Para las distintas proteínas ensayadas, lisozima, invertasa y ferritina, se prepararon disoluciones de las mismas en tampón fosfato 100 mM pH 8.5 a una concentración de 1 mg/mL. A cada uno de los geles, situados en tubos falcon de 15 mL, se le adicionaron 12 mL de cada una de estas disoluciones y cada cierto tiempo se midió la concentración de proteína que quedaba en solución. Para la lisozima y la invertasa la concentración de proteína se midió a 280 nm mientras que para determinar la concentración de ferritina la medida se llevó a cabo a 400 nm. Una vez alcanzado el plató los geles se lavan con H_2O (2x10 mL), NaCl (2x10mL) y de nuevo con H_2O (2x10 mL).

Obtención del mapa de distribución de Fe en gel.

Los análisis han sido tomados en un SEM Leo 1430VP equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de RX (EDS) Inca 350 v. 17 de Oxford instrumentos. Las condiciones de adquisición son: Kilovoltaje de 20Kv, 50 s de tiempo vivo espectros adquiridos en un rango de 0-20KeV, con una resolución de 10ev/Ch en el caso de los mapas esta resolución baja a 20 ev|Ch.

Síntesis del amino derivado del dansilo 117.

A una disolución del azido derivado del dansilo **63** (600 mg, 1.88mmol) en MeOH activado (15mL) se le adiciona Pd/C (60mg). La disolución resultante se hidrogena a 2 atm. durante una noche. Una vez a finalizada la reacción se filtra sobre celita, para eliminar el catalizador, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt:MeOH(2:1)→AcOEt:MeOH (1:2)) obteniéndose **117** como un sólido (502mg, 91%).



P.f.: 153-155 °C; **IR** (film, cm^{-1}): 3360, 3298, 3056, 2838, 2864, 2830, 2784, 1731, 1571, 1454, 1401, 1310, 1139, 1090; **$^1\text{H-RMN}$** (CDCl_3 , 400MHz): 8.54 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-2dan), 8.31 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-8dan), 8.25 (d, 1H, $J=7.3$ Hz, H-4dan), 7.56 (t, 1H, $J=8.3$ Hz) y 7.52 (t, 1H, $J=7.7$ Hz)[H-3,7dan], 7.18 (d, 1H, $J=7.7$ Hz, H-6dan), 2.93 (t, 2H, $J=5.6$ Hz, CH_2NH), 2.89 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.73 (t, 2H, $J=5.6$ Hz, CH_2NH_2); **$^{13}\text{C-RMN}$** (CDCl_3 , 75MHz): 152.1, 134.8, 130.5, 129.9, 129.7, 128.5, 123.3, 118.8, 115.3, 45.5 ($2\times\text{CH}_3$), 45.4, 40.8.

Inmovilización del compuesto 117 sobre los geles 6 y 7.

A cada uno de los geles se les adicionaron 12 mL de una disolución del compuesto **117** de 1 mg/mL en tampón fosfato 100 mM pH 8.5. A medida que se consume el compuesto en solución se llevan a cabo adiciones a partir de una disolución de **117** de 10 mg/mL en MeOH. Se adicionaron un total de 20 mg. Los geles se lavaron extensamente, tanto con H_2O como con NaCl 2M, para eliminar el dansilo que no ha quedado unido covalentemente.

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS DE LÍPIDOS CONTENIENDO GRUPOS VINILSULFONA. NUEVOS AGENTES DE LIPIDACIÓN.

Capítulo 5.

SÍNTESIS DE LÍPIDOS CONTENIENDO GRUPOS VINILSULFONA. NUEVOS AGENTES DE LIPIDACIÓN.

5.1. Lipidómica.

Tras el gran desarrollo de la genómica y la proteómica, la **lipidómica**^{471, 472} ha surgido como un nuevo campo de investigación que avanza rápidamente y que tiene una gran importancia ya que, al igual que los genes y las proteínas, los lípidos también desempeñan funciones cruciales en las células. La lipidómica se dedica al estudio y caracterización del conjunto de las especies lipídicas celulares, las moléculas y macromoléculas con las que interactúan y sus funciones biológicas.

A diferencia de lo que ocurre con otro tipo de biomoléculas, **los lípidos** no se definen mediante una característica estructural común sino por un comportamiento físico-químico, su insolubilidad en agua. Clásicamente se ha considerado que los lípidos cumplen dos funciones generales, una estructural, en la biomembranas, y como reserva energética. Sin embargo, los avances tecnológicos han puesto de manifiesto la existencia de miles de especies lipídicas diferentes en el cuerpo humano sugiriendo la existencia de funciones aún no exploradas como son la señalización celular, el direccionamiento de proteínas hacia su destino celular, el anclaje de proteínas a membranas y la entrada de toxinas, virus y bacterias. Así, por ejemplo, los lípidos de membrana, a través de sus interacciones con las proteínas integrales o asociadas a membrana modulan la función de éstas, su anclaje y tráfico. No nos debe sorprender, por tanto, que existan enfermedades asociadas a un balance defectuoso de lípidos como la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes y la enfermedad de Alzheimer.

471. Spener, F.; Lagarde, M.; Geloën, A.; Record, M., What is lipidomics? *European Journal of Lipid Science and Technology* **2003**, 105, (9), 481-482.

472. Wenk, M. R., The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4, (7), 594-610.

5.1. Objetivos de la lipidómica.

Los principales **objetivos de la lipidómica** son:

- ✓ Nuevas aproximaciones analíticas para la caracterización del lipidoma.
- ✓ Aplicación de métodos biofísicos para el estudio de las interacciones lipido-proteína principalmente en los micro- y nanodominios de las membranas biológicas. Para este tipo de estudios es necesaria, entre otras cosas, la síntesis de lípidos específicos, análogos y sondas.
- ✓ Identificación de la red lipídica, incluyendo los mediadores lipídicos para la regulación metabólica y génica y su integración en sistemas de señalización no lipídicos.

5.2. Lipidación de proteínas: metodologías y aplicaciones.

La actividad de las proteínas no está únicamente controlada por la velocidad de síntesis y degradación sino que también por procesos específicos y selectivos de modificación covalente o modificación post-transduccional que modula interacciones moleculares, localización de proteínas y estabilidad. De las diferentes modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas una de ellas es la **lipidación**, siendo la más relevante la acilación con ácidos grasos. La acilación de proteínas con ácidos grasos implica principalmente a dos de ellos el palmítico⁴⁷³ y el mirístico⁴⁷⁴. La unión a las proteínas se puede dar a través de la formación de distintos tipos de enlaces:

- ✓ Formación de un enlace amida con un residuo de glicina N-terminal. También se ha observado la acilación de proteínas a través de la formación de un enlace amida con el grupo ϵ -amino de las lisinas.
- ✓ Otra posibilidad reside en la S-acilación en la cual tiene lugar la formación de un enlace tioéster con un residuo de cisteína.
- ✓ La unión también se puede establecer a través de un enlace éster con residuos de serina o treonina.

473. Smotrys, J. E.; Linder, M. E., Palmitoylation of intracellular signaling proteins: Regulation and function. *Annual Review of Biochemistry* **2004**, *73*, 559-587.

474. Taniguchi, H., Protein myristoylation in protein-lipid and protein-protein interactions. *Biophysical Chemistry* **1999**, *82*, (2-3), 129-137.

La incorporación de ácidos grasos a la estructura de las proteínas facilita la interacción de éstas con las membranas así como su transporte a través de las mismas^{475,476}. Además, modula ciertas interacciones proteína-proteína⁴⁷⁷ y diversos procesos de señalización⁴⁷⁸. Debido al gran número de mecanismos celulares en los que las proteínas modificadas con grupos de naturaleza lipídica se encuentran implicadas, tiene un gran interés el estudio físico-químico de este tipo de proteínas y de las interacciones en las que intervienen (proteína-proteína y proteína-membrana). La purificación de péptidos y proteínas modificadas con grupos lipídicos no es sencilla debido a su baja concentración celular y a la solubilidad de las mismas⁴⁷⁹. Una posible alternativa consiste en la acilación química de proteínas para su posterior utilización en este tipo de estudios⁴⁸⁰.

Sin embargo, la acilación de proteínas presenta muchas otras **aplicaciones**. Así, por ejemplo, se ha observado que aunque la acilación de péptidos antimicrobianos es bastante rara la obtención de conjugados sintéticos mejora esta actividad⁴⁸¹⁻⁴⁸³. Los lipopéptidos pueden ser utilizados también en el etiquetado de

475.Peitzsch, R. M.; McLaughlin, S., Binding of acylated peptides and fatty-acids to phospholipid-vesicles - pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **1993**, 32, (39), 10436-10443.

476.Towler, D. A.; Gordon, J. I.; Adams, S. P.; Glaser, L., The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annual Review of Biochemistry* **1988**, 57, 69-99.

477.Sankaram, M. B., Membrane interaction of small n-myristoylated peptides - implications for membrane anchoring and protein-protein association. *Biophysical Journal* **1994**, 67, (1), 105-112.

478.James, G.; Olson, E. N., Fatty acylated proteins as components of intracellular signaling pathways. *Biochemistry* **1990**, 29, (11), 2623-2634.

479.Schmidt, M. F. G., Fatty acylation of proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1989**, 988, (3), 411-426.

480.Draper, J. M.; Xia, Z.; Smith, C. D., Cellular palmitoylation and trafficking of lipidated peptides. *Journal of Lipid Research* **2007**, 48, (8), 1873-1884.

481.Doisy, X., Fragment of human lysozyme conjugated on the N-terminus and displaying antibacterial properties. *Biopolymers* **2005**, 80, (4), 542-542.

482.Chu-Kung, A. F.; Bozzelli, K. N.; Lockwood, N. A.; Haseman, J. R.; Mayo, K. H.; Tirrell, M. V., Promotion of peptide antimicrobial activity by fatty acid conjugation. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, 15, (3), 530-535.

483.Avrahami, D.; Shai, Y., A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (13), 12277-12285.

receptores intracelulares^{484,485} y en el desarrollo de vacunas sintéticas^{486,487}. El empleo de proteínas o péptidos terapéuticos para el tratamiento de ciertas enfermedades presenta una enorme importancia en farmacología y biotecnología, además, tiene un gran potencial debido a su elevada especificidad. Sin embargo, su aplicación clínica está limitada, entre otros motivos, por su baja permeabilidad a través de membranas biológicas debido al carácter hidrofílico de estas proteínas. La modificación de péptidos y proteínas con grupos hidrofóbicos, como los ácidos grasos, constituye hoy día una de las posibilidades para aumentar su transporte a través de membranas biológicas^{488, 489}. Mediante esta metodología no sólo se mejora la capacidad de las proteínas para interactuar con las membranas sino que, además, se mantiene la actividad biológica de las mismas^{490, 491}, se ha observado una disminución de la inmunogenicidad de estas proteínas y un descenso en la producción de anticuerpos frente a ellas⁴⁹². De hecho, esta es una de las metodologías que se utiliza para el transporte de agentes terapéuticos hasta

484. Stephens, G.; O'Lunaigh, N.; Reilly, D.; Harriott, P.; Walker, B.; Fitzgerald, D.; Moran, N., A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, (32), 20317-20322.

485. Thiam, K.; Loing, E.; Verwaerde, C.; Auriault, C.; Gras-Masse, H., IFN-gamma-derived lipopeptides: Influence of lipid modification on the conformation and the ability to induce MHC class II expression on murine and human cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, (18), 3732-3736.

486. Deprez, B.; Sauzet, J. P.; Boutillon, C.; Martinon, F.; Tartar, A.; Sergheraert, C.; Guillet, J. G.; Gomard, E.; GrasMasse, H., Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine* **1996**, *14*, (5), 375-382.

487. Zeng, W.; Jackson, D. C.; Rose, K., Synthesis of a new template with a built-in adjuvant and its use in constructing peptide vaccine candidates through polyoxime chemistry. *J Pept Sci* **1996**, *2*, (1), 66-72.

488. Kocevar, N.; Obermajer, N.; Strukelj, B.; Kos, J.; Kreft, S., Improved acylation method enables efficient delivery of functional palmitoylated cystatin into epithelial cells. *Chemical Biology & Drug Design* **2007**, *69*, (2), 124-131.

489. Loing, E.; Delanoye, A.; Sergheraert, C.; Tartar, A.; GrasMasse, H., Assessing delivery of lipopeptides into the cytoplasm of intact cells by a functional assay based on PKC inhibition .1. The Jurkat model. *Peptide Research* **1996**, *9*, (5), 229-232.

490. Martins, M. B. F.; Jorge, J. C. S.; Cruz, M. E. M., Acylation of l-asparaginase with total retention of enzymatic-activity. *Biochimie* **1990**, *72*, (9), 671-675.

491. Kabanov, A. V.; Levashov, A. V.; Alakhov, V. Y.; Martinek, K.; Severin, E. S., Fatty acylation of proteins for translocation across cell membranes. *Biomedical Science (London)* **1990**, *1*, (1), 33-6.

492. Shi, Q.; Domurado, M.; Domurado, D., Effect of protein chemical hydrophobization on antiglycose oxidase immunoglobulin production in mouse. *Pharmacology & Toxicology* **1995**, *76*, (4), 278-285.

el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica⁴⁹³⁻⁴⁹⁵ para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Los sistemas proteína-lípido van más allá. La incorporación de proteínas a **liposomas** está adquiriendo día a día un mayor interés debido, fundamentalmente, a dos razones:

- ✓ Estudios de procesos en membranas. El estudio de interacciones proteína-liposoma que puede contribuir a entender los procesos que tienen lugar en las membranas naturales⁴⁹⁶.
- ✓ Dirección de fármacos. La unión de ciertas proteínas a liposomas puede ayudar a crear sistemas de dirección de fármacos^{497, 498}.

La incorporación de péptidos y proteínas a liposomas se puede llevar a cabo mediante dos estrategias diferentes: a través de la inclusión de proteínas en el liposoma durante la formación del mismo o mediante la unión de la proteína a la bicapa lipídica del liposoma. En esta última opción es necesario que la proteína contenga una región hidrofóbica para que se establezca la asociación y para ello, en muchas ocasiones, se ha llevado a cabo la incorporación química de ácidos grasos mediante unión covalente sobre la estructura de la proteína⁴⁹⁹⁻⁵⁰¹.

493.Chopineau, J.; Robert, S.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Lagoutte, B.; Paitier, S.; Dehouck, M. P.; Domurado, D., Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release* **1998**, 56, (1-3), 231-237.

494.Kabanov, A. V.; Batrakova, E. V., New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, 10, (12), 1355-1363.

495.Chopineau, J.; Robert, S.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Lagoutte, B.; Paitier, S.; Dehouck, M. P.; Domurado, D., Physicochemical characterization and in vitro interaction with brain capillary endothelial cells of artificially monoacylated ribonucleases A. *Letters in Peptide Science* **1997**, 4, (4-6), 313-321.

496.Kimelberg, H. K., Protein-liposome interactions and their relevance to structure and function of cell-membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1976**, 10, (3), 171-190.

497.Finkelstein, M.; Weissmann, G., Introduction of enzymes into cells by means of liposomes. *Journal of Lipid Research* **1978**, 19, (3), 289-303.

498.Gregoriadis, G., Targeting of drugs. *Nature* **1977**, 265, (5593), 407-411.

499.Torchilin, V. P.; Klibanov, A. L., Immobilization of proteins on liposome surface. *Enzyme and Microbial Technology* **1981**, 3, (4), 297-304.

500.Koelsch, R.; Lasch, J.; Klibanov, A. L.; Torchilin, V. P., Incorporation of chemically modified proteins into liposomes. *Acta Biologica Et Medica Germanica* **1981**, 40, (3), 331-335.

501.Torchilin, V. P.; Omelyanenko, V. G.; Klibanov, A. L.; Mikhailov, A. I.; Goldanskii, V. I.; Smirnov, V. N., Incorporation of hydrophilic protein modified with hydrophobic agent into liposome membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1980**, 602, (3), 511-521.

En terapia génica, la incorporación *in vivo* de material genético en el interior de células somáticas constituye la metodología ideal. De hecho, la incorporación de material genético en cultivos de células eucariotas es una técnica estándar de gran importancia para el desarrollo de la Biología Molecular moderna. Los vectores víricos, como los retrovirus o los adenovirus, son muy efectivos pero llevan asociados problemas de toxicidad e inmunogenicidad. Una alternativa es el empleo de métodos no virales entre los cuales los liposomas catiónicos parecen muy prometedores y de hecho ya se están empleando para llevar a cabo **a** en cultivos celulares. Sin embargo, los polímeros con cargas positivas, como la poli-L-lisina (PLL) o la polietiliminina (PEI), constituyen una alternativa muy atractiva ya que son capaces de unirse al ADN y facilitar su entrada a la célula^{502,503}. La incorporación de unidades hidrofóbicas a estos polímeros, como son los ácidos grasos, mejora la eficiencia de los procesos de transfección^{504,505}. Posiblemente esto sea debido a que esta modificación mejora la interacción del complejo ADN-polímero con la bicapa lipídica de la membrana plasmática.

Para la **modificación química** de proteínas con **grupos hidrofóbicos** o la incorporación de éstos a polímeros catiónicos se pueden utilizar diversas metodologías. Así, por ejemplo, se puede llevar a cabo la reacción de los grupos amino de las proteínas o los polímeros con cloruros de ácido^{488, 490} o anhídridos^{506, 507} dando lugar a la formación de enlaces amida (**figura 5.1.**). También es posible

502.Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in-vivo - polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, (16), 7297-7301.

503.Wu, G. Y.; Wu, C. H., Receptor-mediated invitro gene transformation by a soluble dna carrier system. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262, (10), 4429-4432.

504.Han, S. O.; Mahato, R. I.; Kim, S. W., Water-soluble lipopolymer for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (3), 337-345.

505.Wang, D. A.; Narang, A. S.; Kotb, M.; Gaber, A. O.; Miller, D. D.; Kim, S. W.; Mahato, R. I., Novel branched poly(ethylenimine)-cholesterol water-soluble lipopolymers for gene delivery. *Biomacromolecules* **2002**, 3, (6), 1197-1207.

506.Gerbanowski, A.; Rabiller, C.; Larre, E.; Gueguen, J., Grafting of aliphatic and aromatic probes on bovine serum albumin: Influence on its structural and physicochemical characteristics. *Journal of Protein Chemistry* **1999**, 18, (3), 325-336.

507.Pato, C.; Tran, V.; Marion, D.; Douliez, J. P., Effects of acylation on the structure, lipid binding, and transfer activity of wheat lipid transfer protein. *Journal of Protein Chemistry* **2002**, 21, (3), 195-201.

conseguir esta unión mediante el empleo de ésteres activados⁵⁰⁸⁻⁵¹⁰. Otros métodos que se han utilizado han sido las modificaciones quimioselectivas⁵¹¹ o el empleo de la “click-chemistry”⁵⁸.

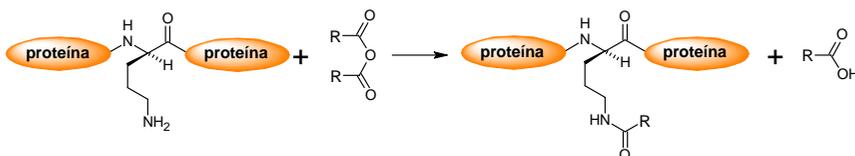
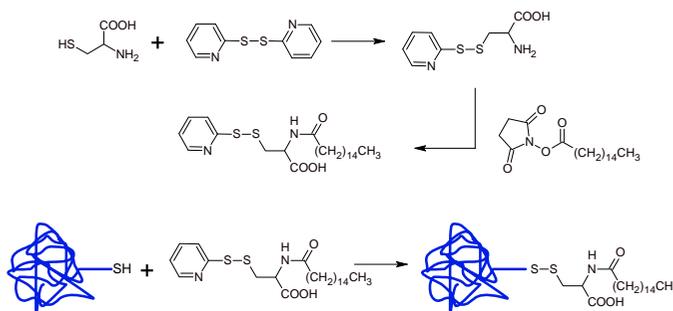


Figura 5.1. Acilación de proteínas mediante el empleo de anhídridos.

Uno de los problemas que presenta este tipo de modificaciones es la insolubilidad de los agentes acilantes en disoluciones acuosas. Para solucionar este problema algunos autores han propuesto el empleo de miscelas reversibles^{495,512} como microreactores o mediante el desarrollo de agentes acilantes solubles en agua⁵¹³ (**figura 5.2.**).



508.Utsumi, T.; Yoshinaga, K.; Koga, D.; Ide, A.; Nobori, K.; Okimasu, E.; Terada, S.; Utsumi, K., Association of a myristoylated protein with a biological membrane and its increased phosphorylation by protein kinase C. *FEBS Letters* **1988**, 238, (1), 13-16.

509.Incáni, V.; Tunis, E.; Clements, B. A.; Olson, C.; Kucharski, C.; Lavasanifar, A.; Uludag, H., Palmitic acid substitution on cationic polymers for effective delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, 81A, (2), 493-504.

510.Abbasi, M.; Uludag, H.; Incáni, V.; Olson, C.; Lin, X.; Clements, B. A.; Rutkowski, D.; Ghahary, A.; Weinfeld, M., Palmitic Acid-Modified Poly-L-Lysine for Non-Viral Delivery of Plasmid DNA to Skin Fibroblasts. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (4), 1059-1063.

511.Bonnet, D.; Rommens, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., Chemoselective acylation of hydrazinopeptides: a novel and mild method for the derivatization of peptides with sensitive fatty acids. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, (1), 45-48.

512.Michel, F.; Pileni, M. P., Synthesis of hydrophobic ribonuclease by using reverse micelles - structural study of aot reverse micelles containing ribonuclease derivatives. *Langmuir* **1994**, 10, (2), 390-394.

513.Ekrami, H. M.; Kennedy, A. R.; Shen, W. C., Water-soluble fatty-acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides. *FEBS Letters* **1995**, 371, (3), 283-286.

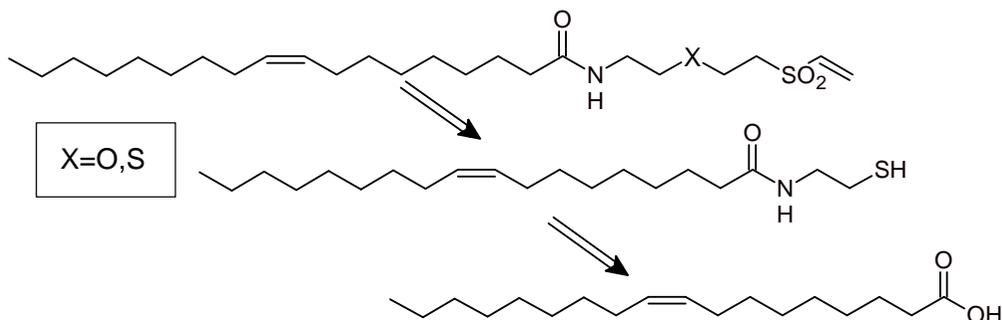
Figura 5.2. Metodología utilizada para la acilación de proteínas en disolución acuosa

5.2 Discusión y resultados.

5.2.1. Funcionalización del ácido oleico con grupos vinilsulfona.

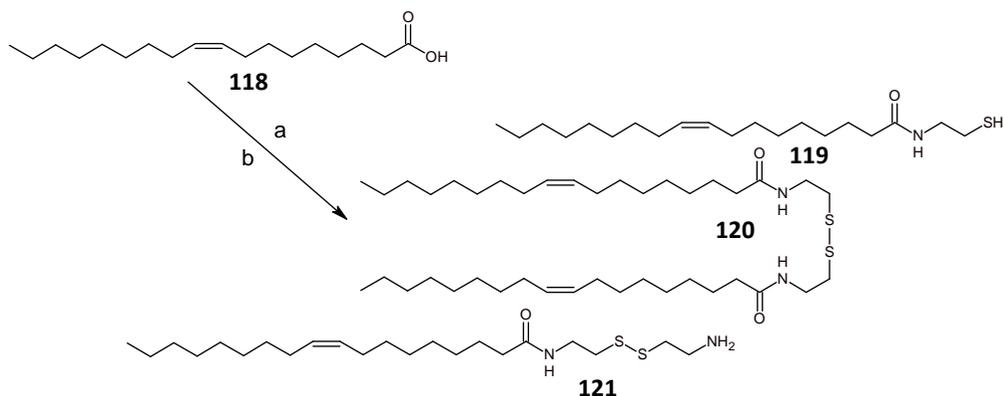
El gran potencial de la **lipidación** de péptidos y proteínas, como se reseñó en la introducción, y los buenos resultados obtenidos en el etiquetado de proteínas a través de los sistemas sintetizados en el **capítulo 2** nos alentó a desarrollar nuevos sistemas de naturaleza lipídica conteniendo la función vinilsulfona.

Como sistema lipídico se decidió trabajar con un ácido graso, y a tal fin se seleccionó el **ácido oleico**. La forma más habitual de funcionalizar un ácido graso es a través de la formación de un enlace amida, de manera que, aprovechando esta reactividad se planteó la incorporación de un grupo tior o hidroxilo capaz de reaccionar con DVS y dejar un grupo vinilsulfona libre, que es el que permitirá su unión a una biomolécula (**esquema 5.1.**).



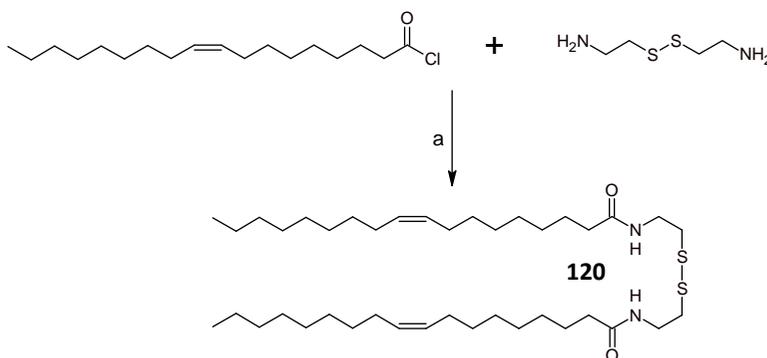
Esquema 5.1. Esquema retrosintético de los compuestos a sintetizar.

Para la incorporación del grupo tior se llevó a cabo la reacción con cisteamina (2-mercaptoetilamina). El ácido oleico se trató con cloruro de tionilo, para generar el cloruro de ácido, y a continuación se llevó a cabo la reacción con un exceso de cisteamina en Cl_2CH_2 anhidro y en presencia de Et_3N . En estas condiciones de reacción se obtiene la mezcla de productos **119-121** debido a la formación de enlaces disulfuro (**esquema 5.2.**). De hecho, si el producto **119** no se utiliza inmediatamente se va transformando en el producto **120**.



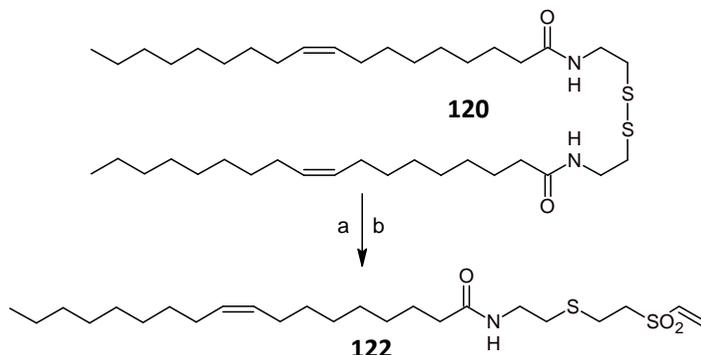
Esquema 5.2. Condiciones: (a) Cl_2SO , 1 hora, (b) Cl_2CH_2 anhidro, cistamina, Et_3N .

Para evitar la formación de una mezcla de productos durante esta primera etapa se llevó a cabo la reacción con cistamina (2,2'-ditiobis(etilamina)), en la cual ya está presente el enlace disulfuro (**esquema 5.3.**). Al igual que en el caso anterior, en primer lugar se generó el cloruro de ácido del ácido oleico y a continuación se llevó a cabo la reacción con cistamina en Cl_2CH_2 anhidro y en presencia de Et_3N , obteniéndose el compuesto **120** con excelentes rendimientos.



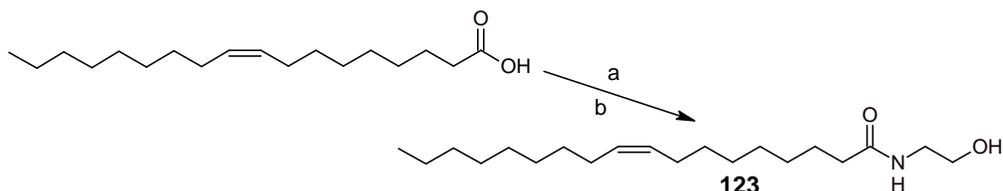
Esquema 5.3. Condiciones: (a) Cl_2CH_2 anhidro, Et_3N , 92%.

La reducción del enlace disulfuro, necesaria para la unión del grupo vinilsulfona, se llevó a cabo con Zn en AcOH . Dada la facilidad con la que se forma el enlace disulfuro, en lugar de purificar el crudo de reacción por cromatografía en columna se llevó a cabo directamente la reacción con DVS. El crudo se disolvió en THF:isopropanol (2:1), al cual previamente se le había burbujeado Ar , y se le adicionó un exceso de DVS y una cantidad catalítica de Et_3N . Tras 1.5 horas la reacción finaliza y se obtiene el derivado con vinilsulfona **122** con un rendimiento global del 69% (**esquema 5.4.**).



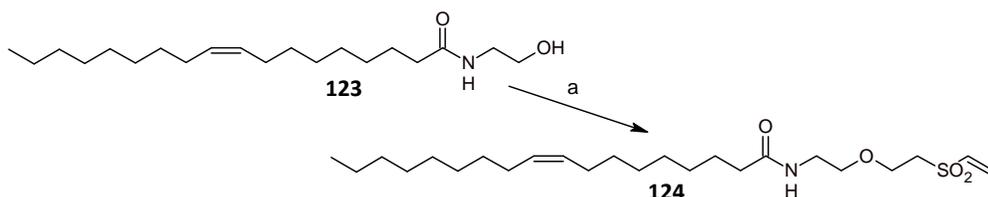
Esquema 5.4. Condiciones: (a) AcOH, Zn, 50°C, 50 minutos, (b) THF: isopropanol (1:2), DVS, Et₃N, 1.5 horas.

Para la incorporación del grupo hidroxilo sobre la estructura de ácido oleico se eligió el 2-aminoetanol. De nuevo se generó el cloruro de ácido del ácido oleico por tratamiento con Cl₂SO y a continuación se llevó a cabo la reacción con un exceso de 2-aminoetanol y Et₃N en Cl₂CH₂ anhidro. En estas condiciones se obtiene el producto deseado **123** con muy buenos rendimientos (**esquema 5.5.**).



Esquema 5.5.Condiciones: (a) Cl₂SO, 1 hora, (b) Cl₂CH₂ anhidro, 2-aminoetanol, Et₃N, 88%.

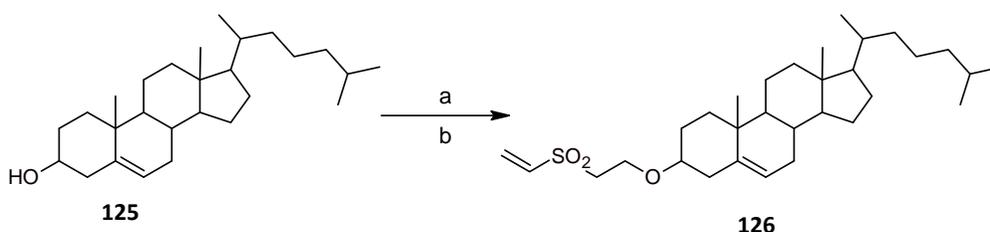
Como en este caso el grupo nucleófilo es un grupo hidroxilo, para hacerlo reaccionar con DVS se utilizaron las mismas condiciones empleadas para la funcionalización del etilenglicol (producto **50**) (t-BuOK como base y THF como disolvente). En estas condiciones la reacción finaliza en cortos periodos de tiempo (15 minutos) y con un rendimiento del 51% (**esquema 5.6.**).



Esquema 5.6. Condiciones: (a)THF, DVS, t-BuOK, 15 minutos, 51%.

5.2.2. Funcionalización del colesterol con grupos vinilsulfona.

Con el objetivo de obtener otros sistemas lipofílicos con centros electrofílicos centramos nuestra atención en el **colesterol** ya que contiene un único grupo hidroxilo en su estructura que puede reaccionar directamente con DVS sin necesidad de una funcionalización previa. Así, se llevó a cabo la reacción del colesterol (1mol) con DVS (1.5moles) en THF y con una cantidad catalítica t-BuOK. Al analizar la evolución de la reacción por c.c.f. no se observa ningún cambio de r.f. en el colesterol. Como ya se ha comprobado en otros casos (**50** y **124**) que en esas condiciones los grupos hidroxilo reaccionan y, además, lo hacen en cortos periodos de tiempo, se optó por mantener la reacción bajo agitación a t.a. durante 1 hora y se aisló el compuesto que presentaba el mismo r.f. que el colesterol. Al registrar el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observó la formación del producto deseado **126** pero también la presencia de colesterol sin reaccionar (**colesterol:126** 1:2). Para conseguir que todo el colesterol de partida reaccionase se empleó un mayor exceso de DVS (2 moles) y se mantuvo la disolución bajo agitación hasta un total de 3 horas. Al igual que en el primer intento, por $^1\text{H-RMN}$ se detectó la presencia de colesterol sin reaccionar y prácticamente en la misma proporción. Para poder separar ambos productos se acetiló la mezcla con piridina y anhídrido acético. En este caso el colesterol acetilado sí que presentaba un r.f. muy diferente al derivado que contiene el grupo vinilsulfona y permitió su separación. Así, para obtener el producto puro se llevó a cabo la reacción del colesterol con DVS en las primeras condiciones ensayadas y tras una hora de reacción se trató con una resina ácida (amberlita IR 120H) durante 30 minutos. Tras filtrar las resinas y eliminar el disolvente se adicionó Ac_2O y piridina y la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente 12 horas. El producto deseado se aisló con un rendimiento del 52%.



Esquema 5.7. Condiciones (a): THF, DVS, t-BuOK, 1 hora, (b) AcOH, piridina, una noche, 52%.

5.2.3. ISCOMs

El acrónimo ISCOMs⁵¹⁴ (“*immunostimulating complex*”) deriva de la capacidad que estas partículas presentan para actuar como complejos inmunoestimuladores cuando se utilizan en vacunas para animales⁵¹⁵. Las investigaciones de este tipo de sistemas explotan la capacidad para actuar como adyuvante (compuestos que actúan de manera no específica para incrementar la inmunidad frente a un antígeno) sigue siendo el centro de investigación de este tipo de sistemas.

En bibliografía se describen dos **tipos** de ISCOMs que difieren en su composición:

- ✓ ISCOM clásico, constituido por saponina, colesterol, fosfolípidos y proteínas.
- ✓ ISCOM básico, también denominado ISCOM matrix, formado únicamente por saponina, colesterol y fosfolípidos.

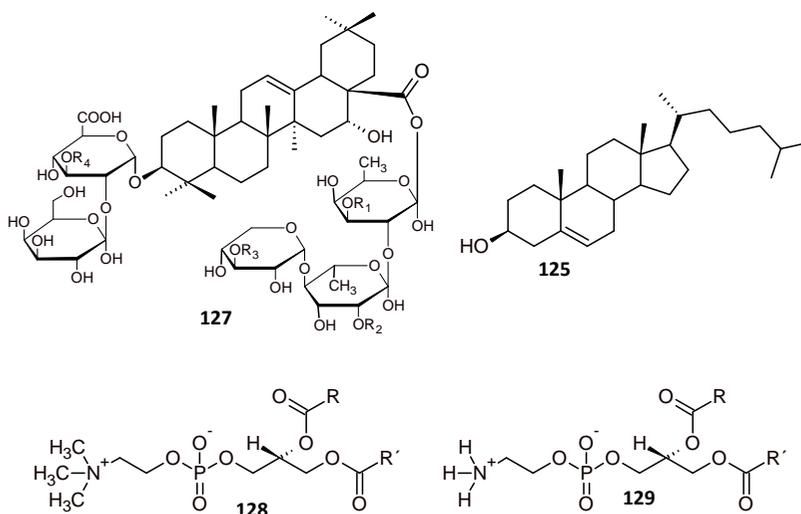


Figura 5.3. Estructura básica de la saponina de Quillaja (**127**), colesterol (**125**), fosfatidilcolina (**128**) y fosfatidil etanolamina (**129**).

514.Barr, I. G.; Mitchell, G. F., ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade. *Immunology and Cell Biology* **1996**, *74*, (1), 8-25.

515.Morein, B.; Sundquist, B.; Hoglund, S.; Dalsgaard, K.; Osterhaus, A., ISCOM, a novel structure for antigenic presentation of membrane-proteins from enveloped viruses. *Nature* **1984**, *308*, (5958), 457-460.

La base de la arquitectura de los ISCOMs son las interacciones que se establecen entre la saponina y el colesterol. Desde un punto de vista **estructural** son partículas esféricas, huecas y con forma de caja, con un tamaño heterogéneo en torno a los 40 nm de diámetro y con carga negativa^{516,517}. Cada ISCOM está constituido por 20 o más subunidades globulares ensambladas en un dodecaedro pentagonal, y una vez formados son tremendamente estables⁵¹⁸.

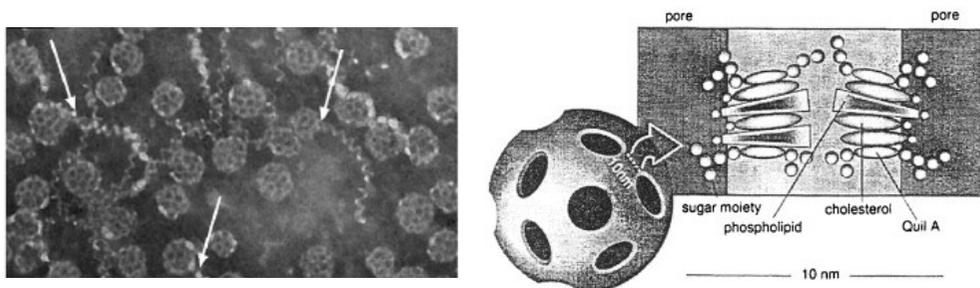


Figura 5.4. Estructura de los ISCOMs tomada del trabajo de Rades y col⁵¹⁹.

Aunque para la formación de los ISCOMs matrix la incorporación de los fosfolípidos no es crítica se ha puesto de manifiesto que su empleo proporciona una mayor uniformidad y estabilidad⁵¹⁷. Sin embargo, su presencia es necesaria si se quieren utilizar los ISCOMs como vehículos de moléculas anfífilas, tales como proteínas de membrana⁵²⁰.

516.Kersten, G. F. A.; Teerlink, T.; Derks, H.; Verkleij, A. J.; Vanwezel, T. L.; Crommelin, D. J. A.; Beuvery, E. C., Incorporation of the major outer-membrane protein of neisseria-gonorrhoeae in saponin-lipid complexes (ISCOMs) - chemical-analysis, some structural features, and comparison of their immunogenicity with 3 other antigen delivery systems. *Infection and Immunity* **1988**, 56, (2), 432-438.

517.Ozel, M.; Hoglund, S.; Gelderblom, H. R.; Morein, B., Quaternary structure of the immunostimulating complex (ISCOM). *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* **1989**, 102, (3), 240-248.

518.Sundquist, B.; Lovgren, K.; Hoglund, S.; Morein, B., Influenza-virus iscoms - biochemical-characterization. *Vaccine* **1988**, 6, (1), 44-48.

519.Myschik, J.; Lendemans, D. G.; McBurney, W. T.; Demana, P. H.; Hook, S.; Rades, T., On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. *Micron* **2006**, 37, (8), 724-734.

520.Lovgren, K.; Morein, B., The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (ISCOMS). *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1988**, 10, (2), 161-172.

Los ISCOMs pueden ser **preparados** por diversos procedimientos, muchos de los cuales son adaptaciones de los métodos de preparación de liposomas⁵²¹. Hasta la fecha se han descrito en bibliografía cinco métodos diferentes: diálisis, centrifugación, hidratación de película lipídica, inyección de etanol e inyección de éter⁵¹⁹. De todos ellos los más extendidos son el de diálisis y el de centrifugación debido a su simplicidad y mayor facilidad para su escalado⁵¹⁴.

Como se reseñó en la introducción, para la **incorporación** de proteínas a un liposoma se dispone de dos estrategias diferentes. Sin embargo, en el caso de los ISCOMs el atrapamiento de proteínas no es posible debido al pequeño tamaño y volumen interno de los mismos. Por lo tanto, para conseguir la incorporación de proteínas a su estructura es necesario que éstas estén provistas de una región hidrofóbica y una de las alternativas existentes es la modificación química de la proteína con grupos de naturaleza lipídica.

Las **aplicaciones** de los ISCOMs se han centrado, sobre todo, en su empleo en vacunas⁵²²⁻⁵²⁴. La incorporación de antígenos a la estructura del ISCOM conduce a la obtención de una respuesta inmune mayor⁵²⁵⁻⁵²⁷, posiblemente debido a la suma del efecto del anticuerpo y a la inmunoestimulación que produce la saponina⁵²⁸. Sin embargo, también han encontrado aplicación como sistemas de

521. Mozafari, M. R., Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters* **2005**, 10, (4), 711-719.

522. Pearse, M. J.; Drane, D., ISCOMATRIX(TM) adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses. *Vaccine* **2004**, 22, (19), 2391-2395.

523. Sanders, M. T.; Brown, L. E.; Deliyannis, G.; Pearse, M. J., ISCOM (TM)-based vaccines: The second decade. *Immunology and Cell Biology* **2005**, 83, (2), 119-128.

524. Claassen, I.; Osterhaus, A., The ISCOM structure as an immune-enhancing moiety - experience with viral systems. *Research in Immunology* **1992**, 143, (5), 531-541.

525. Araujo, F. G.; Morein, B., Immunization with trypanosoma-cruzi epimastigote antigens incorporated into iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infection and Immunity* **1991**, 59, (9), 2909-2914.

526. Lunden, A.; Lovgren, K.; Uggla, A.; Araujo, F. G., Immune-responses and resistance to toxoplasma-gondii in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infection and Immunity* **1993**, 61, (6), 2639-2643.

527. Sjolander, A.; Baldwin, T. M.; Curtis, J. M.; Handman, E., Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *Journal of Immunology* **1998**, 160, (8), 3949-3957.

528. Bengtsson, K. L.; Sjolander, A., Adjuvant activity of iscoms; Effect of ratio and co-incorporation of antigen and adjuvant. *Vaccine* **1996**, 14, (8), 753-760.

vehiculización de anfotericina B y otros fármacos de naturaleza lipídica^{529,530}. Además, se han utilizado como antígenos en inmunoensayos. Bjorkman y col.⁵³¹ incorporaron antígenos a la estructura de los ISCOMs y los utilizaron para recubrir los pocillos de ELISA. De esta manera consiguieron aumentar la sensibilidad y selectividad del ensayo.

5.2.4. Lipidación e incorporación de proteína A a ISCOMs.

La capacidad del derivado del ácido oleico **122** para la lipidación e incorporación de proteínas a ISCOMs ha sido ensayada por Teresa Cruz Bustos, doctoranda del grupo de investigación Bioquímica y Parasitología Molecular dirigido por el Prof. Antonio Osuna. Para llevar a cabo estos estudios se han empleado **ISCOMs matrix** preparados siguiendo el método de diálisis⁵³². Tras ser obtenidos se incubaron con **ficocianina**, ficobilina que es una proteína que contiene varios grupos cromogénicos (tetrapirrólicos lineales) que se encuentran unidos a residuos de cisteína específicos. La presencia de estos grupos permite la visualización de los ISCOMs mediante microscopía de láser confocal.

Por otro lado, se llevó a cabo la **modificación** de proteína A (polipéptido de 42KDa constituyente habitual de la pared celular de "*Staphilococcus aureus*" que tiene afinidad por anticuerpos) con el compuesto **122** utilizando como medio de reacción tampón carbonato pH 8. La mezcla de reacción se incubó a t.a. durante 12 horas tras las cuales se adicionó una disolución de glicina 1M y se volvió a incubar durante 2-3 horas más.

Para la incorporación de la proteína A modificada a la estructura del ISCOM se incubó una solución de ISCOMs-ficocianina con proteína A-compuesto **122**. De esta manera la proteína A se asocia a los ISCOMs a través del resto hidrofóbico que

529.Morein, B.; Loevgren, K. Pharmaceutical carrier consisting of sterol-saporin complex matrices. 92-SE367 9221331, 19920601., 1992.

530.Morein, B.; Bengtsson, K. L., Iscoms as delivery systems. *Proceedings of the International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials* **1997**, 24th, 118.

531.Bjorkman, C.; Lunden, A.; Holmdahl, J.; Barber, J.; Trees, A. J.; Uggla, A., NEOSPORA-CANINUM IN DOGS - DETECTION OF ANTIBODIES BY ELISA USING AN ISCOM ANTIGEN. *Parasite Immunology* **1994**, 16, (12), 643-648.

532.Iosef, C.; Van Nguyen, T.; Jeong, K. I.; Bengtsson, K.; Morein, B.; Kim, Y.; Chang, K. O.; Azevedo, M. S. P.; Yuang, L. J.; Nielsen, P.; Saif, L. J., Systemic and intestinal antibody secreting cell responses and protection in gnotobiotic pigs immunized orally with attenuated Wa human rotavirus and Wa 2/6-rotavirus-like-particles associated with immuno stimulating complexes. *Vaccine* **2002**, 20, 1741-1753.

Capítulo 5

se ha incorporado mediante la reacción con el derivado de vinilsulfona. La capacidad de la proteína A para unirse a anticuerpos se aprovecha para la unión de IgG frente a *Tripanosoma cruzi* (parásito responsable de la enfermedad de Chagas).

Tras obtener el sistema ISCOM-IgG frente a *Tripanosoma cruzi* y para comprobar que a través de esta metodología es posible dirigir los ISCOMs hasta el parásito se llevó a cabo un ensayo de inmunomarcaje. Los epimastigotes del *Tripanosoma cruzi* se fijaron a un portaobjetos con formaldehído y estos se incubaron con:

- ✓ Ficocianina.
- ✓ ISCOM-ficocianina.
- ✓ ISCOM-ficocianina-proteína A.
- ✓ ISCOM-ficocianina-proteína A-IgG.

Los tres primeros ensayos son controles negativos para comprobar la ausencia de interacciones inespecíficas. En el único caso en el que los epimastigotes se marcaron fué con el sistema ISCOM-ficocianina-Proteína A-IgG (**figura 5.5.**) observándose un tenue marcaje inespecífico en el caso de ISCOM-ficocianina-proteína A. Estos resultados ponen de manifiesto que la modificación de la proteína A con el compuesto **122** permite su incorporación a los ISCOMs y que a través de la unión de la proteína A a la IgG es posible dirigir los ISCOMs.

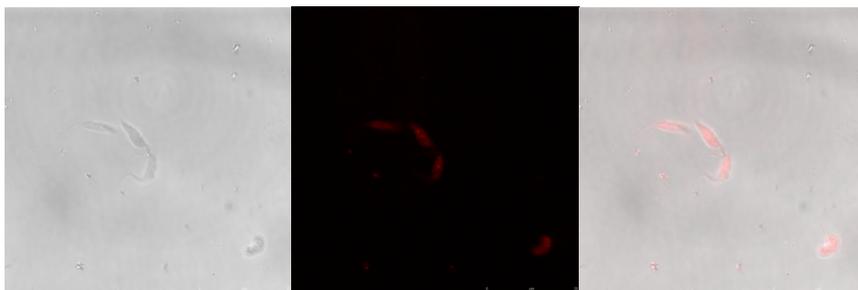


Figura 5.5.

5.2.5. Incorporación del derivado de colesterol-vinilsulfona 126 a la estructura de los ISCOMs.

Ya que uno de los constituyentes de los ISCOMs es el colesterol, el derivado **126** se utilizó para introducir la funcionalización vinilsulfona en su estructura. Para ello se emplearon distintas proporciones colesterol: compuesto **126** en la

preparación de los ISCOMs. Éstos se incubaron con proteína A durante 12 horas en tampón carbonato pH 8 y a continuación se trataron con una solución de glicina 1M. Posteriormente se incubaron con ficocianina y con IgG frente a *Tripanosoma Cruzi*. De nuevo se llevaron a cabo ensayos de inmunomarcaje frente a epimastigotes de *Tripanosoma Cruzi* observándose fluorescencia en aquellos casos en los que se ha empleado el derivado **126** para la preparación de los ISCOMs (**figura 5.6.**). Este resultado indica que el empleo del derivado **126** permite la incorporación de grupos vinilsulfonas a la estructura del ISCOM y que éstos quedan accesibles para su reacción con una biomolécula.

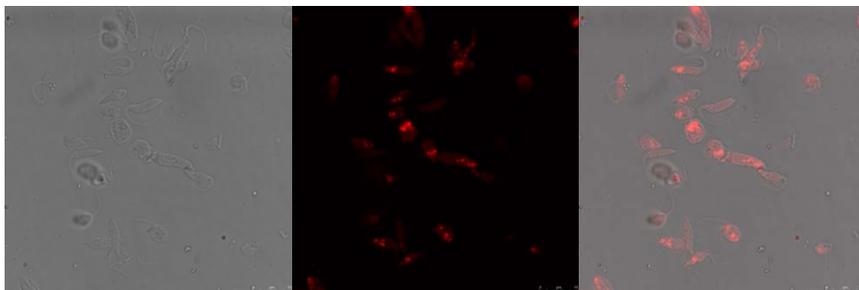


Figura 5.6.

5.3. Conclusiones.

Se ha desarrollado una metodología sencilla y eficiente para la síntesis de ácidos grasos-vinilsulfonas derivados del ácido oleico y para la funcionalización del colesterol con un grupo vinilsulfona.

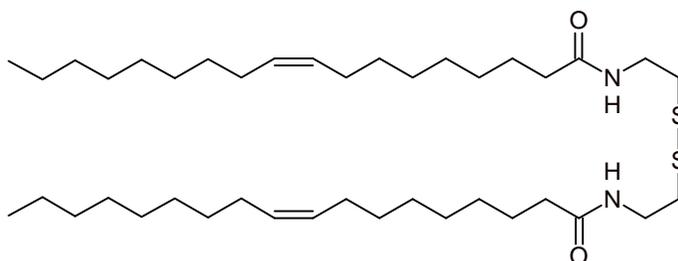
Los resultados de los ensayos de inmunomarcaje realizados ponen de manifiesto la utilidad del compuesto **122** para la incorporación de residuos lipídicos sobre proteínas. Específicamente, nuestros resultados demuestran que la modificación de la proteína A con el compuesto **122** no sólo promueve su incorporación a la estructura del ISCOM, gracias a las cadenas de ácido oleico, sino que además, esta funcionalización no afecta a su capacidad para la unión a anticuerpos. Paralelamente, el compuesto **126** ha demostrado ser útil para la incorporación de grupos vinilsulfona accesibles en la estructura de los ISCOMs. Estos grupos han permitido la unión de la proteína A a los ISCOMs sin afectar a sus propiedades

La funcionalización de ácidos grasos y colesterol con vinilsulfonas es una alternativa factible para el diseño y producción de un sistema para la dirección de ISCOMs, lo cual presenta un elevado potencial en la vehiculización de fármacos.

5.4. Sección experimental.

Procedimiento para la síntesis del compuesto 120⁵³³.

Una disolución de ácido oleico (850 mg, 3 mmol) en Cl_2SO (10 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl_2SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente con tolueno anhidro. El crudo obtenido se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL) y se añadió sobre una disolución de cistamina (260 mg, 1.15 mmol) y Et_3N (0.98 mL, 6.9mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (30 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente con agitación durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 2:1 → éter) obteniéndose **120** como un sólido (720 mg, 92%).



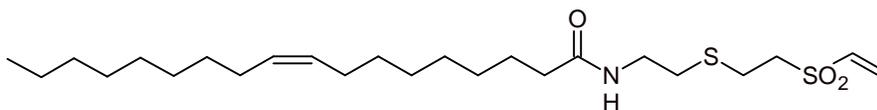
P.f.: 83-85 °C; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3320, 1632, 1536, 1464, 1419, 1261, 1192; **¹H-RMN** (Cl_3CD , 300MHz): δ 6.28 (sa, 2H, NH), 5.34 (m, 4H, 2 x CH=CH), 3.57 (c, 4H, $J=6.3$ Hz), 2.82 (t, 4H, $J=6.4$ Hz), 2.20 (t, 4H, $J=7.5$ Hz), 2.00 (m, 8H), 1.63 (m, 4H), 1.28 (varios m, 40 H), 0.88 (m, 6H); **¹³C-RMN** (Cl_3CD , 75MHz): δ 173.9, 130.2, 129.9, 38.6, 38.1, 36.8, 32.1, 30.0, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6x2, 29.5x2, 29.4, 27.4, 25.9, 22.9, 14.3.; **EM-AR:** (FAB+): calc. para: $\text{C}_{40}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}$: 703.5246; enc.: 703.5250.

Procedimiento para la síntesis del compuesto 122.

533. McCaughan, B.; Kay, G.; Knott, R. M.; Cairns, D., A potential new prodrug for the treatment of cystinosis: Design, synthesis and in-vitro evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, 18, (5), 1716-1719.

Capítulo 5

A una disolución de **120** (960 mg, 1.4 mmol) en AcOH (20 mL) se le añadió Zn (1.1 g, 17 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a 50°C durante 40 min. La disolución se dejó enfriar y se filtró sobre celita para eliminar el Zn. Se adicionó Cl₂CH₂ (70 mL) y se lavó con H₂Ox2 (30 mL), NaHCO₃satx2 (30mL) y con H₂O (30 mL). Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El crudo se disolvió en THF:isopropanol (2:1, 25 mL), al cual se le burbujeó previamente Ar durante 5 min, y se le añadió DVS (809 µL, 5.65 mmol) y Et₃N (40 µL, 0.28 mmol). La disolución resultante se mantuvo bajo agitación magnética a t.a. y en atmósfera de Ar durante 1.5 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter) obteniéndose **122** como un sólido (890 mg, 69%).



P.f.: 85-87 °C; **IR** (KBr, cm⁻¹): 3319, 1632, 1536, 1463, 1418, 1261, 1191;

¹H-RMN (Cl₃CD, 400MHz): δ 6.70(dd, 1H, J= 16.6 y 9.7 Hz, CH=), 6.48 (d, 1H, J=16.6Hz, =CH₂trans), 6.23 (d, 1H, J=9.7 Hz, =CH₂cis), 5.85 (sa, 1H, NH), 5.36 (m, 2H, CH=CH), 3.45 (c, 2H, J=6.4 Hz), 3.26 (m, 2H), 2.91 (m, 2H), 2.71 (t, 2H, J=6.5 Hz), 2.18 (t, 2H, J= 7.6Hz), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.28 (varios m, 20 H), 0.88 (m, 3H);

¹³C-RMN (Cl₃CD, 75MHz): δ 173.5, 136.3, 131.5, 130.2, 129.9, 54.5, 38.5, 36.9, 32.8, 32.7, 32.2, 32.1, 30.0, 29.9, 29.7, 29.5x2, 29.4, 27.4x2, 25.9, 23.9, 22.9, 14.3.;

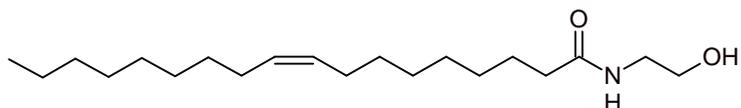
EM-AR: (FAB+): calc. para: C₂₄H₄₅NO₃S₂Na: 482.2738; enc.: 482.2734.

Procedimiento para la síntesis del compuesto 123⁵³⁴.

Una disolución de ácido oleico (1.9 g, 6.7 mmol) en Cl₂SO (15 mL) se mantuvo con agitación magnética a temperatura ambiente durante 1 hora. El exceso de Cl₂SO se eliminó por evaporación a vacío coevaporándose sucesivamente

534. Astarita, G.; Di Giacomo, B.; Gaetani, S.; Oveisi, F.; Compton, T. R.; Rivara, S.; Tarzia, G.; Mor, M.; Piomelli, D., Pharmacological characterization of hydrolysis-resistant analogs of oleoylethanolamide with potent anorexiatic properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, 318, (2), 563-570.

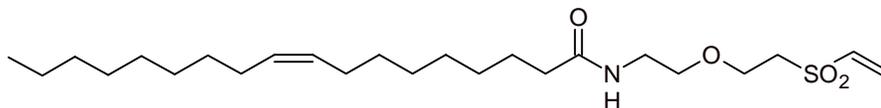
con tolueno anhidro. El crudo obtenido se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (50 mL) y se añadió sobre una disolución de 2-aminoetanol (0.608 mL, 10.1 mmol) y Et_3N (1.9 mL, 13.5 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (50 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a t.a. durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:1 \rightarrow AcOEt) obteniéndose **123** como un sólido (1.93 g, 88%).



P.f.: 59-61 °C; **IR** (KBr, cm^{-1}): 3301, 1642, 1561, 1464, 1265, 1211, 1057, 1035;
 $^1\text{H-RMN}$ (Cl_3CD , 400MHz): δ 6.15 (sa, 1H), 5.35 (m, 2H, CH=CH), 3.72 (t, 2H, $J=5$ Hz), 3.42 (c, 2H, $J=5$ Hz), 2.97 (sa, 1H), 2.20 (t, 2H, $J=7.5$ Hz), 2.02 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.28 (varios m, 20 H), 0.88 (m, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (Cl_3CD , 75MHz): δ 174.7, 130.1, 129.8, 62.4, 42.5, 36.7, 32.0, 29.8x2, 29.6, 29.4x2, 29.3x2, 29.2, 27.3, 27.2, 25.8, 22.7, 14.2.

Procedimiento para la síntesis del compuesto 124.

A una disolución de **123** (780 mg, 2.4 mmol) en THF (100 mL) se le añadió DVS (497 μL , 4.8 mmol) y t-BuOK (30 mg, 0.27 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 15 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 2:1 \rightarrow AcOEt) obteniéndose **124** como un sirope (538 mg, 51%).

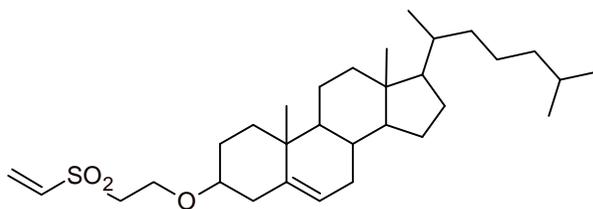


Capítulo 5

IR (film, cm^{-1}): 3303, 1646, 1541, 1460, 1379, 1312, 1249, 1124; **$^1\text{H-RMN}$** (Cl_3CD , 400MHz): δ 6.71(dd, 1H, $J=16.4$ y 9.7 Hz, CH=), 6.45 (d, 1H, $J=16.4$ Hz, = CH_2 trans), 6.14 (d, 1H, $J=9.6$ Hz, = CH_2 cis), 6.12 (sa, 1H, NH), 5.35 (m, 2H, CH=CH), 3.91 (t, 2H, $J=5.4$ Hz), 3.57 (t, 2H, $J=5$ Hz), 3.46 (c, 2H, $J=5.2$ Hz), 3.26 (t, 2H, $J=5.4$ Hz), 2.18 (t, 2H, $J=7.7$ Hz), 2.01 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.28 (varios m, 20 H), 0.88 (m, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (Cl_3CD , 300MHz): δ 173.5, 137.6, 130.0, 129.8, 129.5, 70.0, 63.9, 54.6, 38.8, 36.7, 32.0, 29.8x2, 29.6, 29.4x2, 29.2, 27.3x2, 25.8, 22.8, 14.2.; **EM-AR:** (FAB+): calc. para: $\text{C}_{24}\text{H}_{45}\text{NO}_4\text{SNa}$: 466.2967; enc.: 466.2968.

Procedimiento para la síntesis del compuesto 126.

A una disolución de colesterol (300 mg, 0.77 mmol) en THF (20 mL) se le añadió DVS (0.12 mL, 1.16 mmol) y t-BuOK (9 mg, 0.077mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Se le adicionaron resinas ácidas (amberlita IR 120H) y se mantuvo bajo agitación a t.a durante 30 minutos. Las resinas se filtraron, el disolvente se evaporó a presión reducida y al crudo se le adicionó Ac_2O y piridina y se dejó acetilando una noche. El Ac_2O y la piridina se eliminaron a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna (éter-hexano 1:2) obteniéndose **126** como un sólido (204 mg, 52%).



P.f.: 133-135 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}$ -19 (c 1, Cl_3CH); **IR** (KBr, cm^{-1}): 3409, 1461, 1373, 1319, 1115, 1052; **$^1\text{H-RMN}$** (Cl_3CD , 400MHz): δ 6.75 (dd, 1H, $J=16.7$ y 9.9 Hz, CH=), 6.40 (d, 1H, $J=16.7$ Hz, = CH_2 trans), 6.07 (d, 1H, $J=9.9$ Hz, = CH_2 cis), 5.35 (sa, 1H, =CHcolesterol), 3.88 (t, 2H, $J=5.6$ Hz), 3.23 (t, 2H, $J=5.6$ Hz), 3.19 (m, 1H), 2.35-1.84 (varios m, 7H), 1.56-0.95 (varios m, 21H), 0.99 (s, 3H), 0.92 (d, 3H, $J=6.4$ Hz), 0.86 (d, 6H, $J=6.6$ Hz), 0.67 (s, 3H); **$^{13}\text{C-RMN}$** (Cl_3CD , 125MHz): δ 140.2, 138.0, 128.5, 122.1, 79.8, 61.5, 56.7, 56.1, 55.4, 50.1, 42.3, 39.7, 39.5, 38.8, 37.0, 36.8, 36.2, 35.8, 31.9, 31.8, 28.2, 28.1, 28.0, 24.3, 23.8, 22.9, 22.5, 21.0, 19.3, 18.7, 11.8. ; **EM-AR:** (FAB+) cal. para $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3\text{SNa}$: 527.3535; enc.: 527.3535.

CAPÍTULO 6.
SÍNTESIS Y APLICACIONES DE NUEVOS
MATERIALES POLIMÉRICOS BASADOS EN
POLISACÁRIDOS Y DIVINILSULFONA.

Capítulo 6.

SÍNTESIS Y APLICACIONES DE NUEVOS MATERIALES POLIMÉRICOS BASADOS EN POLISACÁRIDOS Y DIVINILSULFONA.

6.1. Polímeros basados en polisacáridos.

6.1.1. Generalidades.

Los hidrogeles son materiales poliméricos entrecruzados en forma de red tridimensional de origen natural o sintético que se hinchan en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos. Estos sistemas poliméricos han tenido y tienen un gran interés debido a sus aplicaciones biomédicas^{535,536} (sistemas de liberación controlada de fármacos, inmovilización de enzimas, sistemas de eliminación de agua corporal...) en el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de contaminantes⁵³⁷⁻⁵³⁹. El entrecruzamiento, necesario para generar la estructura tridimensional, se puede establecer a través de métodos físicos o químicos, lo que hace que en ocasiones se clasifiquen en dos grandes grupos: hidrogeles covalentes o químicos, en los cuales se establecen enlaces covalentes entre las distintas cadenas poliméricas, e hidrogeles físicos, en los cuales el entrecruzamiento se produce gracias a interacciones de tipo físico como interacciones iónicas⁵⁴⁰, enlaces de hidrógeno⁵⁴¹ o incluso interacciones antígeno-

535. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, (1), 27-46.

536. Hoffman, A. S., Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (1), 3-12.

537. Crini, G., Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science* **2005**, 30, (1), 38-70.

538. Crini, G., Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology* **2006**, 97, (9), 1061-1085.

539. Delval, F.; Crini, G.; Vebrel, J., Removal of organic pollutants from aqueous solutions by adsorbents prepared from an agroalimentary by-product. *Bioresource Technology* **2006**, 97, (16), 2173-2181.

540. Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A., Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials* **2000**, 21, (21), 2155-2161.

541. Haglund, B. O.; Josi, R.; Himmelstein, K. J., An in situ gelling system for parenteral delivery. *Journal of Controlled Release* **1996**, 41, (3), 229-235.

Capítulo 6

anticuerpo⁵⁴². Recientemente ha surgido un nuevo tipo de materiales en el cual los centros de entrecruzamiento no están fijos sino que son móviles. Este tipo de materiales fue propuesto por Genne⁵⁴³ y desarrollado por Okura y col.^{544,545} y reciben el nombre de “*sliding gels*”.

Los **polisacáridos** son uno de los sistemas utilizados en la preparación de hidrogeles. Éstos son biomoléculas, que cumplen funciones muy diversas, principalmente de reserva energética y estructurales, formadas por un gran número de monosacáridos unidos entre sí a través de enlaces glicosídicos y. Sus características y propiedades hacen que constituyan una materia prima única ya que son:

- ✓ Biopolímeros naturales muy abundantes y baratos.
- ✓ Estables, hidrofílicos, biodegradables, biocompatibles y no tóxicos.
- ✓ Estructuras polifuncionales que pueden sufrir modificaciones.
- ✓ Quirales y presentan capacidad de adsorción y quelatación.

Los **agentes o reactivos de entrecruzamiento** son compuestos que permiten unir dos o más moléculas mediante enlaces covalentes. Estas sustancias deben poseer al menos dos grupos reactivos, normalmente en posiciones terminales, y pueden ser homofuncionales o heterofuncionales, dependiendo de que sus grupos reactivos sean iguales o distintos. Los grupos funcionales que intervienen en el entrecruzamiento de las cadenas de los polisacáridos son los grupos hidroxilo, carboxilo y amino, pero también es posible modificar químicamente al polisacárido para introducir otro tipo de grupos reactivos. Entre los reactivos de entrecruzamiento utilizados para la reticulación de las cadenas de

542.Miyata, T.; Asami, N.; Uragami, T., A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* **1999**, 399, (6738), 766-769.

543.de Gennes, P. G., Sliding gels. *Physica A* **1999**, 271, (3-4), 231-237.

544.Okumura, Y.; Ito, K., The polyrotaxane gel: A topological gel by figure-of-eight cross-links. *Advanced Materials* **2001**, 13, (7), 485-+.

545.Ito, K.; Shimomura, T.; Okumura, Y., Nanostructures formed by combination of nanotube and polymer chain. *Macromolecular Symposia* **2003**, 201, 103-110.

546.Murai, S.; Imajo, S.; Inumaru, H.; Takahashi, K.; Hattori, K., Adsorption and recovery of ionic surfactants by beta-cyclodextrin polymer. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, 190, (2), 488-490.

547.Li, J. S.; Xiao, H. N.; Li, J. H.; Zhong, Y. P., Drug carrier systems based on water-soluble cationic beta-cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 278, (2), 329-342.

polisacáridos el más empleado ha sido, con diferencia, la epiclorhidrina (EPI)⁵⁴⁶⁻⁵⁵⁶. La EPI es una molécula bifuncional que contiene dos grupos funcionales diferentes y presenta una elevada reactividad frente a grupos hidroxilo en condiciones alcalinas.

Dialdehídos, como el glutaraldehído (GLA), se han utilizado sobre todo para el entrecruzamiento de proteínas⁵⁵⁷, aunque también han encontrado un hueco dentro de los polisacáridos. Los polisacáridos que contienen grupos amino pueden entrecruzarse en condiciones suaves mediante el empleo de GLA, lo que da lugar a la formación de bases de Schiff. Hasta la fecha el GLA es el reactivo que más se ha empleado para llevar a cabo el entrecruzamiento de quitosano⁵⁵⁸⁻⁵⁶⁰. Sin embargo, para que reaccionen los grupos hidroxilo es necesario emplear condiciones más drásticas, como son bajos pH y altas temperaturas.

-
- 548.**Baek, K.; Yang, J. S.; Kwon, T. S.; Yang, J. W., Cationic starch-enhanced ultrafiltration for Cr(VI) removal. *Desalination* **2007**, 206, (1-3), 245-250.
- 549.**Mundargi, R. C.; Shelke, N. B.; Rokhade, A. P.; Patil, S. A.; Aminabhavi, T. M., Formulation and in-vitro evaluation of novel starch-based tableted microspheres for controlled release of ampicillin. *Carbohydrate Polymers* **2008**, 71, (1), 42-53.
- 550.**Ivanov, C.; Popa, M.; Ivanov, M.; Popa, A. A., Synthesis of poly(vinyl alcohol) - methyl cellulose hydrogel as possible scaffolds in tissue engineering. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2007**, 9, (11), 3440-3444.
- 551.**Zhou, J.; Chang, C.; Zhang, R.; Zhang, L., Hydrogels prepared from unsubstituted cellulose in NaOH/Urea aqueous solution. *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, (6), 804-809.
- 552.**Qin, C. Q.; Du, Y. M.; Zhang, Z. Q.; Liu, Y.; Xiao, L.; Shi, X. W., Adsorption of chromium (VI) on a novel quaternized chitosan resin. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, 90, (2), 505-510.
- 553.**Chiou, M. S.; Ho, P. Y.; Li, H. Y., Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. *Dyes and Pigments* **2004**, 60, (1), 69-84.
- 554.**Dogan, A. K.; Gumusderelioglu, M.; Aksoz, E., Controlled release of EGF and bFGF from dextran hydrogels in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2005**, 74B, (1), 504-510.
- 555.**Spychaj, T.; Bartkowiak, A., Polyvalent metal cation modified dextran hydrogels: Non-size
- 556.**Simkovic, I.; Hricovini, M.; Soltes, L.; Mendichi, R.; Cosentino, C., Preparation of water-soluble/insoluble derivatives of hyaluronic acid by cross-linking with epichlorohydrin in aqueous NaOH/NH₄OH solution. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41, (1), 9-14.
- 557.**Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C., Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques* **2004**, 37, (5), 790-+.
- 558.**Zan, J.; Chen, H. H.; Jiang, G. Q.; Lin, Y.; Ding, F. X., Preparation and properties of crosslinked chitosan thermosensitive hydrogel for injectable drug delivery systems. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 101, (3), 1892-1898.
- 559.**Ruiz, M.; Sastre, A. M.; Guibal, E., Palladium sorption on glutaraldehyde-crosslinked chitosan. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, 45, (3), 155-173.
- 560.**Chiou, M. S.; Li, H. Y., Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. *Chemosphere* **2003**, 50, (8), 1095-1105.

Otros reactivos de entrecruzamiento también usados frecuentemente en la reticulación de polisacáridos son los diisocianatos⁵⁶¹⁻⁵⁶⁶, en concreto el que más se ha utilizado ha sido el 1,6-hexametilendiisocianato (HMDI o HMI). Estos compuestos reaccionan con los grupos hidroxilo dando lugar a la formación de carbamatos y con aminas se forman ureas. Bisepóxidos, como el etilenglicol diglicidil éter o el 1,4-butanediol diglicidil éter, también se han utilizado para la obtención de hidrogeles de polisacáridos⁵⁶⁷⁻⁵⁶⁹. Estos derivados son capaces de reaccionar con grupos amino y en condiciones alcalinas con grupos hidroxilo.

Otros agentes de entrecruzamiento utilizados en mucha menor medida son, la benzoquinona⁵⁷⁰, el oxiclورو de f6foro⁵⁷¹, ácidos carboxílicos⁵⁷² o carbodiimidas⁵⁷³.

561.Yamasaki, H.; Makihata, Y.; Fukunaga, K., Efficient phenol removal of wastewater from phenolic resin plants using crosslinked cyclodextrin particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2006**, 81, (7), 1271-1276.

562.Hovgaard, L.; Brondsted, H., DEXTRAN HYDROGELS FOR COLON-SPECIFIC DRUG-DELIVERY. *Journal of Controlled Release* **1995**, 36, (1-2), 159-166.

563.Ikai, T.; Muraki, R.; Yamamoto, C.; Kamigaito, M.; Okamoto, Y., Cellulose derivative-based beads as chiral stationary phase for HPLC. *Chemistry Letters* **2004**, 33, (9), 1188-1189.

564.Magnani, A.; Lamponi, S.; Consumi, M.; Barbucci, R., Biological performance of two materials based on sulfated hyaluronic acid and polyurethane. *Journal of Materials Chemistry* **1999**, 9, (10), 2393-2398.

565.Omen, E. Y.; Sezgin, M.; Yilmaz, A.; Yilmaz, M., Synthesis of beta-cyclodextrin and starch based polymers for sorption of azo dyes from aqueous solutions. *Bioresource Technology* **2008**, 99, (3), 526-531.

566.Choudhari, S. K.; Kittur, A. A.; Kulkarni, S. S.; Kariduraganavar, M. Y., Development of novel blocked diisocyanate crosslinked chitosan membranes for pervaporation separation of water-isopropanol mixtures. *Journal of Membrane Science* **2007**, 302, (1-2), 197-206.

567.Silioc, C.; Maleki, A.; Zhu, K. Z.; Kjoniksen, A. L.; Nystrom, B., Effect of hydrophobic modification on rheological and swelling features during chemical gelation of aqueous polysaccharides (vol 8, pg 724, 2007). *Biomacromolecules* **2007**, 8, (5), 1764-1764.

568.Mi, F. L.; Shyu, S. S.; Chen, C. T.; Lai, J. Y., Adsorption of indomethacin onto chemically modified chitosan beads. *Polymer* **2002**, 43, (3), 757-765.

569.Rodriguez-Tenreiro, C.; Alvarez-Lorenzo, C.; Rodriguez-Perez, A.; Concheiro, A.; Torres-Labandeira, J. J., Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 66, (1), 55-62.

570.McAfee, B. J.; Gould, W. D.; Nadeau, J. C.; da Costa, A. C. A., Biosorption of metal ions using chitosan, chitin, and biomass of *Rhizopus oryzae*. *Separation Science and Technology* **2001**, 36, (14), 3207-3222.

571.Rosa, A. H.; Goveia, D.; Bellin, I. C.; Lessa, S. D.; Dias, N. L.; Padilha, P. D., New analytical procedure based on a cellulose bag and ionic exchanger with p-aminobenzoic acid groups for differentiation of labile and inert metal species in aquatic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 386, (7-8), 2153-2160.

572.Seidel, C.; Kulicke, W. M.; Hess, C.; Hartmann, B.; Lechner, M. D.; Lazik, W., Influence of the cross-linking agent on the gel structure of starch derivatives. *Starch-Starke* **2001**, 53, (7), 305-310.

573.Sannino, A.; Pappada, S.; Madaghiele, M.; Maffezzoli, A.; Ambrosio, L.; Nicolais, L., Crosslinking of cellulose derivatives and hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Polymer* **2005**, 46, (25), 11206-11212.

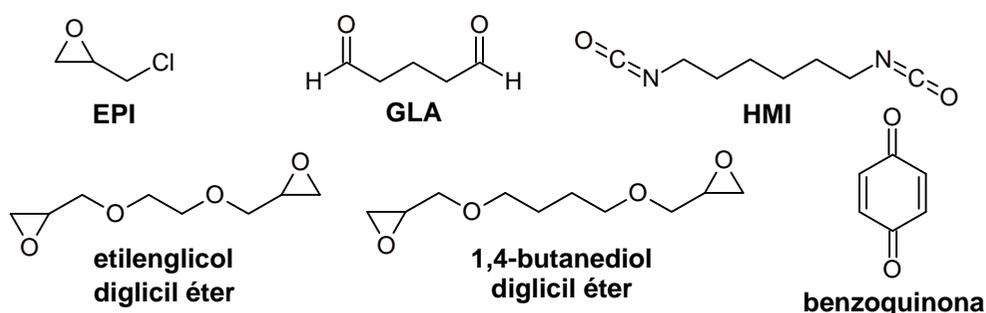


Figura 6.1. Estructuras de algunos de los agentes de entrecruzamiento más frecuentes.

6.1.2. Vinilsulfonas como agentes de entrecruzamiento.

6.1.2.1. Síntesis en medios fuertemente básicos.

Dextrano

Como ya se ha comentado en la introducción de la Tesis (**sección 1.3.2.1.**) la DVS se ha utilizado como agente de entrecruzamiento en distintos sistemas, entre los cuales se encuentran los polisacáridos. La DVS es capaz de reaccionar con los grupos hidroxilo presentes en las cadenas de los polisacáridos en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 10$). Leon y col.⁵⁷⁴ utilizaron esta metodología para llevar a cabo el entrecruzamiento del **dextrano** dando lugar a la obtención de geles con buenas propiedades de flujo, así como con buenas propiedades mecánicas lo que permitió su empleo en cromatografía de afinidad de lectinas. Polimerizaron el dextrano en condiciones alcalinas (NaOH) y en presencia de distintas cantidades de DVS. Y comprobaron que a medida que aumenta la cantidad de DVS disminuye la capacidad de unión hacia la lectina hasta que se alcanza un plató. Según estos autores las condiciones óptimas para cromatografía de afinidad son las proporcionadas por los polímeros correspondientes al plató, pues son materiales de características homogéneas.

574. Young, N. M.; Leon, M. A., Preparation of affinity-chromatography media from soluble polysaccharides by cross-linkage with divinyl sulfone. *Carbohydrate Research* **1978**, 66, (OCT), 299-302.

Capítulo 6

De forma similar McBride y col.¹²³ llevaron a cabo la síntesis de geles de dextrano y estudiaron la capacidad estos sistemas para retener y liberar proteínas modelo., demostrando el potencial de este tipo de sistemas.

Celulosa.

Otros polisacáridos que también se han entrecruzado mediante el empleo de DVS han sido los derivados de **celulosa**, ya que la celulosa como tal es insoluble. Los trabajos pioneros en estos hidrogeles fueron de Oppermann y col.⁵⁷⁵ quienes entrecruzaron carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxietilcelulosa (HEC).¹³⁶ En el caso de la CMC comprobaron que la eficiencia del entrecruzamiento era baja e indican que ésto puede ser debido a que la mayoría de los grupos hidroxilo situados en la posición C6, que son más reactivos que los presentes en C2 y C3, se encuentran sustituidos por grupos carboximetilo y a la existencia de repulsiones electrostáticas que impiden que las cadenas se sitúen próximas entre sí. Sin embargo, en la HEC aunque se introducen cadenas alquílicas en posición C6, éstas llevan incorporados nuevos grupos hidroxilo, lo que hace que el entrecruzamiento con DVS sí sea efectivo. Por otro lado, también comprobaron que en los geles de CMC la presencia de cargas en la estructura hace que mejoren las propiedades de hinchamiento del material, que están relacionadas con la capacidad de estos sistemas para absorber grandes cantidades de agua. Estos resultados les llevaron a entrecruzar mezclas de CMC e HEC en distintas proporciones para así aprovechar las ventajas de ambos derivados.

A partir de este trabajo, y debido al gran interés que este tipo de materiales poseen en campos tales como la liberación controlada de fármacos, el desarrollo de productos superabsorbentes, en ingeniería de tejidos etc..., han sido muchos los grupos que han intentado controlar y mejorar las propiedades de estos materiales. Para ello han llevado a cabo estudios en los que intentan relacionar las propiedades de estos hidrogeles tales como grado de entrecruzamiento, contenido de cargas, capacidad de hinchamiento y otras propiedades estructurales, con las condiciones

575. Anbergen, U.; Oppermann, W., Elasticity and swelling behavior of chemically cross-linked cellulose ethers in aqueous systems. *Polymer* **1990**, 31, (10), 1854-1858.

de síntesis^{125, 576-578}, variando factores como:

- ✓ La concentración de la disolución de polisacárido.
- ✓ La cantidad de DVS y la incorporación de derivados como el PEG para variar la longitud del agente de entrecruzamiento.
- ✓ La naturaleza de los derivados de celulosa y la proporción de los mismos. Se ha utilizado CMC, HEC, HPC (hidroxipropilcelulosa), MC (metilcelulosa) y HPMC (hidroxipropilmetilcelulosa), entre otros.

Así, por ejemplo, cuanto menor es la concentración de DVS y mayor la proporción CMC/HEC la cantidad de agua que estos sistemas son capaces de absorber aumenta lo cual es debido a que la densidad de entrecruzamiento es menor y a que la concentración de grupos iónicos es mayor. Incluso se han desarrollado distintas metodologías para estudiar el grado de entrecruzamiento^{579, 580} ya que éste influye enormemente en las propiedades de gel.

Además, se han propuesto distintas estrategias de síntesis y procesado para modificar la microestructura de los geles⁵⁸¹⁻⁵⁸³ ya que ésta también influye en las propiedades de adsorción de estos materiales. Así, Nicolais y col.^{584,585} han

576. Harsh, D. C.; Gehrke, S. H., Controlling the swelling characteristics of temperature-sensitive cellulose ether hydrogels. *Journal of Controlled Release* **1991**, *17*, (2), 175-185.

577. Maleki, A.; Beheshti, N.; Zhu, K. Z.; Kjoniksen, A. L.; Nystrom, B., Shrinking of chemically cross-linked polymer networks in the postgel region. *Polymer Bulletin* **2007**, *58*, (2), 435-445.

578. Sannino, A.; Maffezzoli, A.; Nicolais, L., Introduction of molecular spacers between the crosslinks of a cellulose-based superabsorbent hydrogel: Effects on the equilibrium sorption properties. *Journal of Applied Polymer Science* **2003**, *90*, (1), 168-174.

579. Lionetto, F.; Sannino, A.; Mensitieri, G.; Maffezzoli, A., Evaluation of the degree of cross-linking of cellulose-based superabsorbent hydrogels: A comparison between different techniques. *Macromolecular Symposia* **2003**, *200*, 199-207.

580. Lenzi, F.; Sannino, A.; Borriello, A.; Porro, F.; Capitani, D.; Mensitieri, G., Probing the degree of crosslinking of a cellulose based superabsorbing hydrogel through traditional and NMR techniques. *Polymer* **2003**, *44*, (5), 1577-1588.

581. Kabra, B. G.; Gehrke, S. H.; Spontak, R. J., Microporous, responsive hydroxypropyl cellulose gels. 1. Synthesis and microstructure. *Macromolecules* **1998**, *31*, (7), 2166-2173.

582. Kato, N.; Gehrke, S. H., Microporous, fast response cellulose ether hydrogel prepared by freeze-drying. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2004**, *38*, (3-4), 191-196.

583. Lu, X. H.; Hu, Z. B.; Gao, J., Synthesis and light scattering study of hydroxypropyl cellulose microgels. *Macromolecules* **2000**, *33*, (23), 8698-8702.

584. Esposito, F.; DelNobile, M. A.; Mensitieri, G.; Nicolais, L., Water sorption in cellulose-based hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science* **1996**, *60*, (13), 2403-2407.

585. Sannino, A.; Nicolais, L., Concurrent effect of microporosity and chemical structure on the equilibrium sorption properties of cellulose-based hydrogels. *Polymer* **2005**, *46*, (13), 4676-4685.

estudiado la influencia del secado del gel una vez formado (con acetona, a vacío o a presión atmosférica) sobre su microestructura y Gherke y col.⁵⁸⁶ han obtenido geles de celulosa con forma esférica haciendo uso de una técnica de polimerización mediante suspensión en tolueno.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los campos donde los hidrogeles presentan gran interés es en el desarrollo de materiales superabsorbentes. De hecho, Sannino y col.⁵⁸⁷ sintetizaron un hidrogel de celulosa con DVS y pusieron de manifiesto su capacidad para eliminar agua del cuerpo, aplicación que tiene gran importancia en el tratamiento de ciertas patologías como por ejemplo en el fallo renal crónico o edemas de origen cardiaco o hepático. Esta capacidad de retener grandes cantidades de agua también se puede aprovechar en la obtención de productos absorbentes y biodegradables para la higiene personal⁵⁸⁸.

Ácido hialurónico.

El **ácido hialurónico** (HA) es un polisacárido del tipo de los glucosaminoglucanos constituido por unidades de N-acetil glucosamina y ácido glucorónico (**figura 6.2.**). Tiene una textura viscosa y la capacidad de retener grandes cantidades de agua, forma parte de los tejidos conectivos y cumple una función estructural. Este polisacárido, por sus propiedades, tiene una gran importancia en el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles y biodegradables con aplicaciones en la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos, viscosuplementación (infiltración intraarticular de ácido hialurónico y derivados indicada para tratamiento de patologías degenerativas de la articulación de la rodilla), en cosmética etc... Para poder desarrollar estas aplicaciones es necesario mejorar las propiedades mecánicas y químicas de este polisacárido, y para ello una de las metodologías que se ha utilizado ha sido el entrecruzamiento con DVS, obteniéndose un material que recibe el nombre de “*hylan b*” o “*hylaform*”.

586.Oconnor, S. M.; Gehrke, S. H., Synthesis and characterization of thermally-responsive hydroxypropyl methylcellulose gel beads. *Journal of Applied Polymer Science* **1997**, 66, (7), 1279-1290.

587.Sannino, A.; Esposito, A.; Nicolais, L.; Del Nobile, M. A.; Giovane, A.; Balestrieri, C.; Esposito, R.; Agresti, M., Cellulose-based hydrogels as body water retainers. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2000**, 11, (4), 247-253.

588.Marci, G.; Mele, G.; Palmisano, L.; Pulito, P.; Sannino, A., Environmentally sustainable production of cellulose-based superabsorbent hydrogels. *Green Chemistry* **2006**, 8, (5), 439-444.

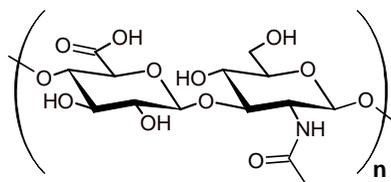


Figura 6.2. Estructura del ácido hialurónico.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que estos hidrogeles de HA entrecruzados con DVS (“hylan b” o “hylaform”) son biocompatibles y no inmunogénicos⁵⁸⁹⁻⁵⁹¹. Dependiendo del grado de entrecruzamiento, se obtienen materiales con propiedades muy diversas que hacen que sus posibilidades en el campo de la medicina sean muy amplias. Así, por ejemplo, aquellos en los que el grado de entrecruzamiento es menor pueden ser utilizados en viscosuplementación y otros con un grado mayor están indicados para reducir los procesos de adhesión tras una cirugía.

Varios autores^{589,592,593} han puesto de manifiesto la potencialidad del “hylan b” como material de relleno en cirugía estética, pudiéndose utilizar en implantes y rellenos. Este hidrogel, además de alisar pliegues subcutáneos, estimula la producción de colágeno, lo que multiplica y prolonga su efecto rejuvenecedor. Ramamurthi y col.¹²⁴ comprobaron que estos hidrogeles de HA entrecruzados con DVS son capaces de estimular la adhesión y la proliferación celular, e incluso han conseguido mejorar esta capacidad mediante el empleo de radiación UV⁵⁹⁴ y

589. Piacquadio, D.; Jarcho, M.; Goltz, R., Evaluation of hylan b gel as a soft-tissue augmentation implant material. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1997**, 36, (4), 544-549.

590. Larsen, N. E.; Lombard, K. M.; Parent, E. G.; Balazs, E. A., Effect of hylan on cartilage and chondrocyte cultures. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society* **1992**, 10, (1), 23-32.

591. Larsen, N. E.; Leschiner, E.; Balazs, E. A.; Belmonte, C., Biocompatibility of hylan polymers in various tissue compartments. *Materials Research Society Symposium Proceedings* **1995**, 394, (Polymers in Medicine and Pharmacy), 149-53.

592. Manna, F.; Dentini, M.; Desideri, P.; De Pita, O.; Mortilla, E.; Maras, B., Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (Hylaform((R)) from rooster combs and Restylane((R)) from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **1999**, 13, (3), 183-192.

593. Larsen, N. E.; Leshchiner, E.; Pollak, C. T.; Balazs, E. A.; Piacquadio, D., Evaluation of hylan B (hylan gel) as soft tissue dermal implants. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 1995, 394, (Polymers in Medicine and Pharmacy), 193-7.

594. Ramamurthi, A.; Vesely, I., Ultraviolet light-induced modification of crosslinked hyaluronan gels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 66A, (2), 317-329.

gamma⁵⁹⁵. Esta propiedad hace que este tipo de materiales tengan una gran importancia en ingeniería de materiales para el desarrollo de órganos bioartificiales u órganos biohíbridos (órganos artificiales compuestos de biomateriales y células. El biomaterial puede actuar como una membrana o como un “*scaffold*”). Así, estos mismos autores han demostrado que este hidrogel es capaz de inducir la síntesis de elastina en cultivos con el objetivo de obtener estructuras que puedan reemplazar la matriz de elastina de la válvula aórtica⁵⁹⁶.

6.1.2.2. Síntesis en condiciones fisiológicas.

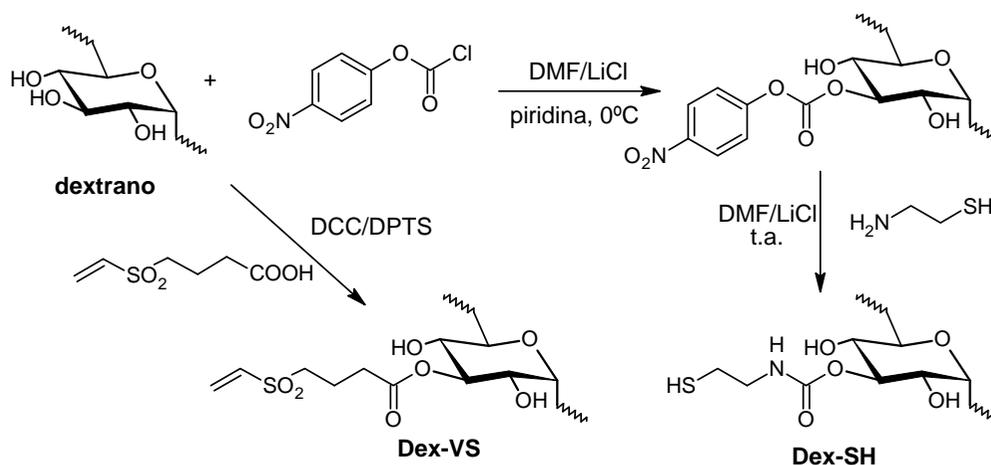
La capacidad de las vinilsulfonas para intervenir como electrófilos en reacciones de adición tipo Michael frente a grupos amino o tiol como nucleófilos, ha sido aprovechada por el grupo de Feijen y col.^{597,598} para llevar a cabo la síntesis de hidrogeles de dextrano en condiciones fisiológicas. El desarrollo de esta metodología requiere la introducción de grupos tiol o vinilsufona en las cadenas del dextrano. Para modificar el dextrano con grupos tiol (Dex-SH) los grupos hidroxilo de las unidades de azúcar fueron activados con 4-nitrofenilcloroformiato y a continuación se llevó a cabo la reacción con cisteamina (**esquema 6.1.**). Para reducir los posibles puentes disulfuro que puedan formarse utilizaron ditioeritritol (DTE). En el caso de la modificación con grupos vinilsufona (Dex-VS) se siguió el esquema que aparece en la **esquema 6.1.** La formación del hidrogel tiene lugar rápidamente, a temperatura ambiente y en condiciones fisiológicas (pH 7) tras mezclar soluciones acuosas de Dex-VS con Dex-SH o PEG-SH. El tiempo de gelación, así como las propiedades del gel (mecánicas y tiempo de degradación) dependen del grado de sustitución, peso molecular del dextrano y de la concentración, lo que permite, en cierta medida, obtener hidrogeles a la carta.

595. Srinivas, A.; Ramamurthi, A., Effects of gamma-irradiation on physical and biologic properties of crosslinked hyaluronan tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering* **2007**, 13, (3), 447-459.

596. Ramamurthi, A.; Vesely, I., Evaluation of the matrix-synthesis potential of crosslinked hyaluronan gels for tissue engineering of aortic heart valves. *Biomaterials* **2005**, 26, (9), 999-1010.

597. Hiemstra, C.; van der Aa, L. J.; Zhong, Z. Y.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J., Novel in situ forming, degradable dextran hydrogels by Michael addition chemistry: Synthesis, rheology, and degradation. *Macromolecules* **2007**, 40, (4), 1165-1173.

598. Hiemstra, C.; van der Aa, L. J.; Zhong, Z. Y.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J., Rapidly in situ-forming degradable hydrogels from dextran thiols through michael addition. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (5), 1548-1556.



Esquema 6.1. Metodología empleada para la incorporación de grupos tiol y vinilsulfona en la estructura del dextrano.

El interés de esta metodología reside en la posibilidad de llevar a cabo el entrecruzamiento de estos sistemas en presencia de compuestos con interés terapéutico tales como proteínas, la mayoría de los cuales no resistiría las condiciones básicas que se requieren para la polimerización de los grupos hidroxilo y, además, la presencia de nucleófilos en su estructura provocaría la polimerización de las mismas. Así, estos mismos autores han aprovechado la selectividad cinética que presentan las vinilsulfonas hacia los grupos tiol con respecto a los grupos amino para llevar a cabo la formación de estos geles en presencia de distintas proteínas⁵⁹⁹. Con ello pretenden desarrollar sistemas que permitan la liberación controlada de proteínas con fines terapéuticos. Obtuvieron hidrogeles de Dex-VS con PEG-SH en presencia de proteínas modelo, BSA, lisozima y IgG, y factor de crecimiento de fibroblasto, y estudiaron su liberación *in vitro*, poniendo así en manifiesto su potencialidad en este campo.

⁵⁹⁹Hiemstra, C.; Zhong, Z. Y.; van Steenberg, M. J.; Hennink, W. E.; Jan, F. J., Release of model proteins and basic fibroblast growth factor from in situ forming degradable dextran hydrogels. *Journal of Controlled Release* **2007**, 122, (1), 71-78.

6.1.2.3. Síntesis de heteropolímeros.

La DVS no sólo se ha utilizado para la obtención de homopolímeros de polisacáridos sino que también ha sido explotada en la preparación de heteropolímeros. Nicolais y col.⁶⁰⁰ llevaron a cabo el entrecruzamiento de HA con mezclas de CMC e HEC utilizando como agente de entrecruzamiento DVS al objeto de desarrollar materiales que eviten la adhesión de tejido blando tras una cirugía.

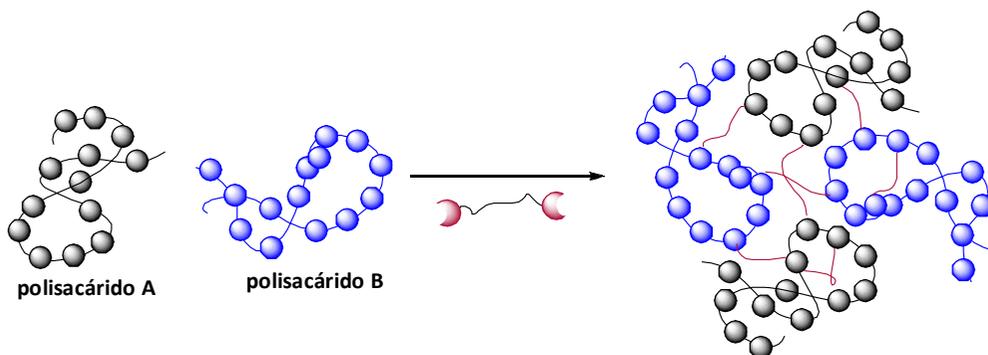


Figura 6.3. Síntesis de heteropolímeros.

El grupo de Kato ha llevado a cabo la síntesis de heteropolímeros de CD con celulosa utilizando la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD), la propia β -CD y distintos derivados de celulosa (HPC, HPMC, CMC). Estos autores han aprovechado la capacidad que tienen las CDs para formar complejos de inclusión con distintas moléculas orgánicas y han utilizado estos geles para la eliminación de bisfenol-A de disoluciones acuosas⁶⁰¹. El bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano) es un compuesto que se utiliza de forma regular en la fabricación de numerosos productos plásticos gracias a su capacidad como estabilizante. Entre otros muchos, el bisfenol A se emplea en la obtención de resinas epoxi, alquifenoles, poliéster-estirenos y algunas resinas de poliéster. Estos plásticos son habituales en envases para alimentos, botellas destinadas a bebés, envases plásticos retornables de zumos, leche y agua e incluso contenedores para microondas y utensilios de cocina.

⁶⁰⁰.Sannino, A.; Madaghiele, M.; Conversano, F.; Mele, G.; Maffezzoli, A.; Netti, P. A.; Ambrosio, L.; Nicolais, L., Cellulose derivative-hyaluronic acid-based microporous hydrogels cross-linked through divinyl sulfone (DVS) to modulate equilibrium sorption capacity and network stability. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (1), 92-96.

⁶⁰¹.Kato, N.; Nihei, A.; Sakai, Y., Removal of bisphenol A from aqueous solutions by inclusion and adsorption on cyclodextrin immobilized in the thermosensitive gel. *Transactions of the Materials Research Society of Japan* **2003**, 28, (3), 993-996.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la toxicidad del bisfenol A, incluso a muy bajas concentraciones, de ahí el interés por el desarrollo de sistemas que sean capaces de reducir su concentración. Además, también se ha aprovechado esta capacidad de encapsulamiento para controlar la detección de quórum^{602,603} (“*quorum sensing*” QS) en bacterias Gram negativas. Se trata de un mecanismo de control de expresiones génicas dependiente de la densidad celular y que, por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* regula la síntesis y liberación de factores de virulencia. Las moléculas sensoras que intervienen en estas bacterias son las acil-homoserina-lactonas (acil-HSL), las cuales son capaces de formar complejos de inclusión con las ciclodextrinas. Esta capacidad para regular el QS hace que puedan constituir una nueva estrategia para el tratamiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano.

6.1.3 Aplicación en el tratamiento de aguas contaminadas.

La contaminación del agua con sustancias tóxicas, como son los metales pesados, moléculas aromáticas o colorantes, supone un problema medioambiental de primera magnitud que puede llegar a convertirse, si no lo es ya en algunos casos, en un problema sanitario. Así, por ejemplo, los metales no son biodegradables pero sí bioacumulables por lo que su cada vez más frecuente presencia en cantidades traza constituye un peligro potencial para la salud.

Muchos de estos contaminantes se encuentran presentes en el medioambiente, y más concretamente en el agua, como consecuencia de su uso industrial. La existencia de una legislación cada vez más estricta hace que la descontaminación del agua sea un campo prioritario en el sector industrial. Para la eliminación de estos contaminantes del agua existen diferentes alternativas como son: tratamientos biológicos⁶⁰⁴, procesos de membrana⁶⁰⁵, procesos avanzados de

602.Kato, N.; Morohoshi, T.; Nozawa, T.; Matsumoto, H.; Ikeda, T., Control of gram-negative bacterial quorum sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2006**, 56, (1-2), 55-59.

603.Kato, N.; Tanaka, T.; Nakagawa, S.; Morohoshi, T.; Hiratani, K.; Ikeda, T., Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2007**, 57, (1-4), 419-423.

604.Pearce, C. I.; Lloyd, J. R.; Guthrie, J. T., The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments* **2003**, 58, (3), 179-196.

605.Goncharuk, V. V.; Kucheruk, D. D.; Kochkodan, V. M.; Badekha, V. P., Removal of organic substances from aqueous solutions by reagent enhanced reverse osmosis. *Desalination* **2002**, 143, (1), 45-51.

Capítulo 6

oxidación⁶⁰⁶, técnicas químicas y electroquímicas⁶⁰⁷ y procesos de adsorción⁶⁰⁸⁻⁶¹³. Sin embargo la adsorción sigue siendo el método más extendido y hoy día es considerado un método efectivo, eficiente y económico tanto para la descontaminación de agua así como para fines analíticos. En este campo los procesos de adsorción son utilizados para la preconcentración de diferentes compuestos ya que, en ocasiones, los niveles de contaminantes permitidos por ley están próximos a los límites de detección utilizados para su cuantificación.

Entre los diferentes materiales utilizados en estos procesos de adsorción podemos destacar los carbones activos⁶⁰⁸, las zeolitas⁶¹⁴, las arcillas⁶¹¹, la sílica⁶¹⁵ y diferentes materiales poliméricos⁶¹⁶ entre otros, siendo los carbones activos los más empleados a pesar de su elevado coste, sobre todo en lo referente a su regeneración. Recientemente se han llevado a cabo un gran número de estudios para el desarrollo de adsorbentes basados en polímeros naturales que sean efectivos y más baratos. En concreto, una alternativa atractiva es el diseño de materiales basados en polisacáridos^{537,538}, pues a su disponibilidad y bajo coste se unen sus características estructurales, propiedades físico-químicas, estabilidad y

606.Al-Momani, F.; Touraud, E.; Degorce-Dumas, J. R.; Roussy, J.; Thomas, O., Biodegradability enhancement of textile dyes and textile wastewater by VUV photolysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2002**, 153, (1-3), 191-197.

607.Hu, C. Y.; Lo, S. L.; Kuan, W. H., Effects of co-existing anions on fluoride removal in electrocoagulation (EC) process using aluminum electrodes. *Water Research* **2003**, 37, (18), 4513-4523.

608.Chern, J. M.; Chien, Y. W., Competitive adsorption of benzoic acid and p-nitrophenol onto activated carbon: isotherm and breakthrough curves. *Water Research* **2003**, 37, (10), 2347-2356.

609.Pereira, M. F. R.; Soares, S. F.; Orfao, J. J. M.; Figueiredo, J. L., Adsorption of dyes on activated carbons: influence of surface chemical groups. *Carbon* **2003**, 41, (4), 811-821.

610.Rivera-Utrilla, J.; Bautista-Toledo, I.; Feffo-García, M. A.; Moreno-Castilla, C., Bioadsorption of Pb(II), Cd(II), and Cr(VI) on activated carbon from aqueous solutions. *Carbon* **2003**, 41, (2), 323-330.

611.Shen, Y. H., Removal of phenol from water by adsorption-flocculation using organobentonite. *Water Research* **2002**, 36, (5), 1107-1114.

612.Lopez, F. A.; Martín, M. I.; Perez, C.; Lopez-Delgado, A.; Alguacil, F. J., Removal of copper ions from aqueous solutions by a steel-making by-product. *Water Research* **2003**, 37, (16), 3883-3890.

613.Robinson, T.; Chandran, B.; Nigam, P., Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw. *Water Research* **2002**, 36, (11), 2824-2830.

614.Bosso, S. T.; Enzweiler, J., Evaluation of heavy metal removal from aqueous solution onto scolecite. *Water Research* **2002**, 36, (19), 4795-4800.

615.Ghoul, M.; Bacquet, M.; Morcellet, M., Uptake of heavy metals from synthetic aqueous solutions using modified PEI - silica gels. *Water Research* **2003**, 37, (4), 729-734.

616.Atia, A. A.; Donia, A. M.; Abou-El-Enein, S. A.; Yousif, A. M., Studies on uptake behaviour of copper(II) and lead(II) by arnine chelating resins with different textural properties. *Separation and Purification Technology* **2003**, 33, (3), 295-301.

resencia de grupos reactivos (hidroxilo, acetamido o amino) que les confieren selectividad frente a metales y compuestos aromáticos.

6.1.3.1. Eliminación de compuestos aromáticos y colorantes.

Existe una abundante bibliografía al respecto cuya revisión exhaustiva escapa del objetivo de la presente introducción. El polisacárido que más se ha utilizado en aplicaciones de descontaminación ha sido el quitosano⁵⁶⁰. Sin embargo, en la actualidad, está creciendo el interés hacia otros polisacáridos, como el almidón o las ciclodextrinas, que son los que nosotros hemos seleccionado para llevar a cabo nuestras investigaciones.

Las **ciclodextrinas** son oligosacáridos cíclicos constituidos por diferentes unidades de D-glucosa con una unión α -1,4 (α -CD seis glucosas, β -CD siete glucosas y γ -CD ocho glucosas) que poseen una estructura toroidal característica con una cavidad bien definida y de carácter hidrofóbico rodeada de dos superficies hidrofílicas. Forman complejos de inclusión con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos⁶¹⁷, tanto en solución como en fase sólida a través de interacciones anfitrión-huésped y en esta propiedad se basa su utilización como material adsorbente de contaminantes orgánicos. Sin embargo, este potencial está limitado por su elevada solubilidad en agua que hace necesario el entrecruzamiento de las mismas.

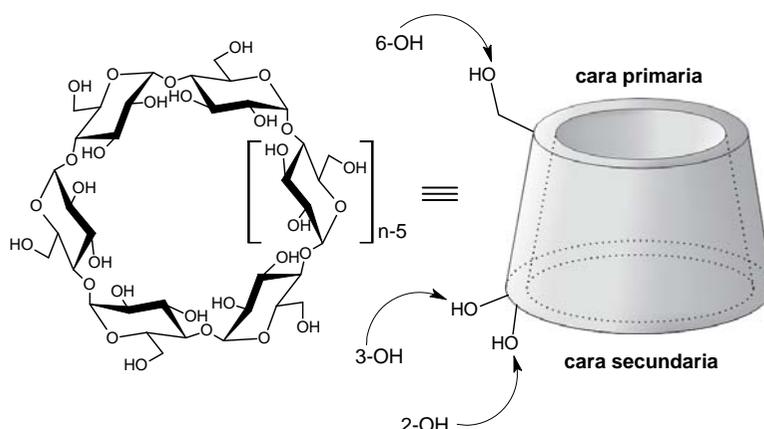


Figura 6.4. Estructura esquemática de la α -CD ($n=6$), β -CD ($n=7$) y γ -CD ($n=8$).

⁶¹⁷Szejtli, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews* **1998**, 98, (5), 1743-1753.

	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad en agua(g/100mL)	14.5	18.5	23.2
Diámetro de la cavidad (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Volumen de la cavidad (Å²)	174	262	472

Tabla 6.1. Características de las ciclodextrinas comunes.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, uno de los agentes de entrecruzamiento más utilizados en polisacáridos es la epichlorhidrina. Así Motumura y col.⁶¹⁸ estudiaron la adsorción de varios compuestos aromáticos (fenol, 4-metilbifenilo y dodecil benceno sulfonato de sodio) sobre polímeros de β -CD obtenidos mediante el entrecruzamiento de ésta con EPI. Además de establecer las isotermas de adsorción para los diferentes compuestos estudiados comprobaron que mediante el tratamiento de los polímeros con metanol era posible desorber los diferentes compuestos y regenerar el material para su posible reutilización, lo cual tiene un gran interés desde un punto de vista económico. Haciendo uso del mismo agente de entrecruzamiento Crini y col.⁶¹⁹ llevaron a cabo la síntesis de diferentes polímeros variando la proporción EPI: β -CD y estudiaron su capacidad de adsorción frente a fenol(P), β -naftol (BN), 4-nitrofenol (pNP) y ácido benzoico (BA). En general, para los diferentes polímeros sintetizados se cumple que la capacidad de adsorción varía en sentido BN>pNP>BA>P en condiciones neutras y, además, esta capacidad aumenta al aumentar el contenido de β -CD en el material sintetizado.

618.Kiji, J.; Konishi, H.; Okano, T.; Terashima, T.; Motomura, K., Adsorption of organic-species by a cyclodextrin epichlorohydrin network polymer. *Angewandte Makromolekulare Chemie* **1992**, 199, 207-210.

619.Crini, G.; Bertini, S.; Torri, G.; Naggi, A.; Sforzini, D.; Vecchi, C.; Janus, L.; Lekchiri, Y.; Morcellet, M., Sorption of aromatic compounds in water using insoluble cyclodextrin polymers. *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 68, (12), 1973-1978.

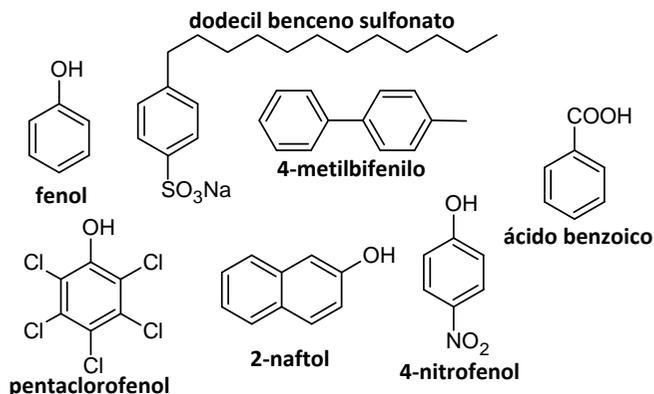


Figura 6.5. Estructuras de los principales compuestos modelos empleados en los estudios de adsorción con polímeros basados en polisacáridos.

Los polímeros de β -CD entrecruzada con EPI también se han utilizado para la eliminación de otros contaminantes como el bisfenol A⁶²⁰ y el dibenzofurano y su derivados⁶²¹. Los dibenzofuranos son un grupo de sustancias con una estructura similar a las dioxinas, son químicamente estables, muy liposolubles y de baja biodegradabilidad. Son altamente tóxicos y cancerígenos⁶²² y, además, muy persistentes en el medio ambiente, de ahí la importancia de su eliminación. Tanto para el bisfenol A como para los dibenzofuranos, los polímeros obtenidos a partir de β -CD por entrecruzamiento con EPI presentan una elevada eficiencia de adsorción a partir de soluciones acuosas y, además, para el caso del bisfenol A esta adsorción es estable tanto en medio ácido como en medio básico.

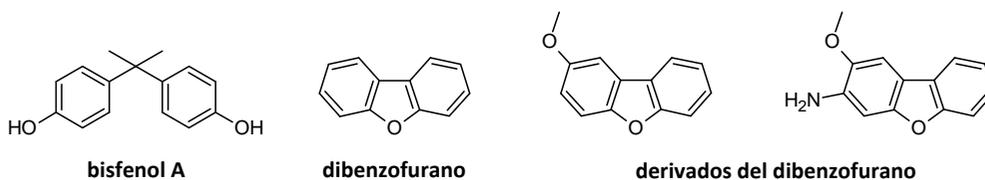


Figura 6.6. Estructuras del bisfenol A y del dibenzofurano y derivados.

620.Kitaoka, M.; Hayashi, K., Adsorption of bisphenol A by cross-linked beta-cyclodextrin polymer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, 44, (1-4), 429-431.

621.Romo, A.; Penas, F. J.; Isasi, J. R., Sorption of dibenzofuran derivatives from aqueous solutions by beta-cyclodextrin polymers: an isosteric heat approach. *Journal of Colloid and Interface Science* **2004**, 279, (1), 55-60.

622.Fletcher, C. L.; McKay, W. A., Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFS) in the aquatic environment - a literature-review. *Chemosphere* **1993**, 26, (6), 1041-1069.

Además de la EPI los diisocianatos^{561,623} también se han empleado como agentes de entrecruzamiento para la obtención de materiales adsorbentes basados en CDs dando lugar a diferentes materiales con excelentes propiedades para la eliminación de compuestos aromáticos. De la abundante bibliografía cabe destacar el trabajo de Krause y col.⁶²⁴ que describe la formación de polímeros de α , β y γ -CD y ponen de manifiesto la capacidad de estos materiales para eliminar compuestos aromáticos en un amplio rango de concentraciones, desde ppb hasta ppt. Además, mediante lavado con etanol son capaces de regenerar los polímeros sin que pierdan eficiencia. Estos mismos autores han llevado a cabo la síntesis de polímeros de β -CD a partir de una serie de derivados monofuncionalizados de β -CD⁶²⁵ y han mejorado las propiedades de adsorción del 4-nitrofenol y del pentaclorofenol (PCP).

Otro polisacárido empleado en la preparación de este tipo de sistemas ha sido el **almidón**. Mediante su entrecruzamiento más que conseguir hacerlo insoluble (hay muchos almidones que los son) es necesario para mejorar sus propiedades químicas y físicas. El almidón ha sido empleado por Crini y col.^{539, 626} como polisacárido de partida y EPI como agente de entrecruzamiento. En uno de sus trabajos⁵³⁹ describen el entrecruzamiento en presencia de NH_4OH , dando lugar a materiales que contienen aminas terciarias. Comprobaron que la presencia de estas aminas no influía en la capacidad de adsorción del polímero, exceptuando en el caso del PCP, para el cual parecen mejorar las propiedades. Sin embargo, estos mismos autores han comprobado que la presencia de estas aminas influye, de forma considerable en algunos casos, cuando estos materiales se utilizan para la

623.Li, D. Q.; Ma, M., Nanosponges: From inclusion chemistry to water purifying technology. *Chemtech* **1999**, 29, (5), 31-37.

624.Mhlanga, S. D.; Marnba, B. B.; Krause, R. I.; Malefetse, T. J., Removal of organic contaminants from water using nanosponge cyclodextrin polyurethanes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2007**, 82, (4), 382-388.

625.Mamba, B. B.; Krause, R. W.; Malefetse, T. J.; Nxumalo, E. N., Monofunctionalized cyclodextrin polymers for the removal of organic pollutants from water. *Environmental Chemistry Letters* **2007**, 5, (2), 79-84.

626.Delval, F.; Crini, G.; Janus, L.; Vebrel, J.; Morcellet, M., Novel crosslinked gels with starch derivatives. Polymer-water interactions. Applications in waste water treatment. *Macromolecular Symposia* **2001**, 166, 103-108.

eliminación de ciertos colorantes^{627,628} los cuales constituyen, al igual que los compuestos aromáticos, una fuente de contaminación importante. Algunos de los colorantes que han usado en estos estudios se recogen en la **figura 6.7.**:

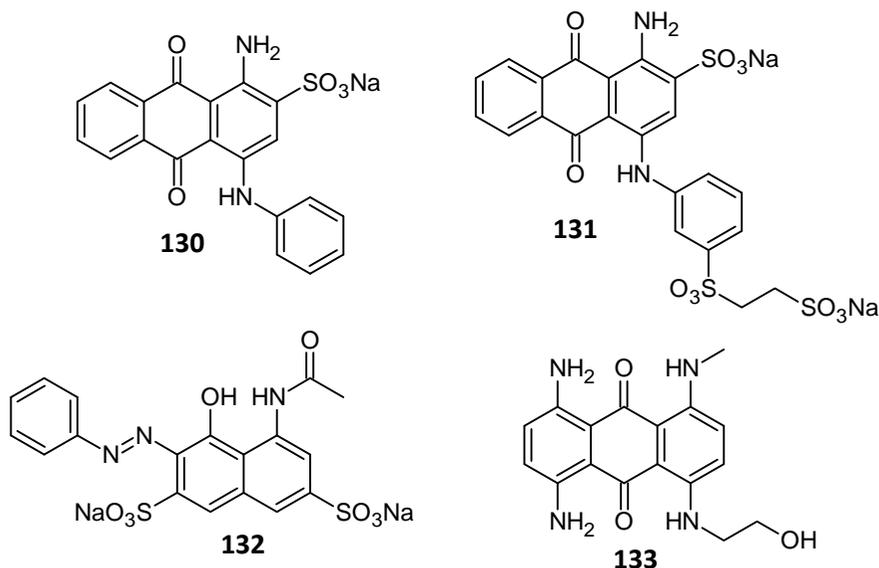


Figura 6.7. Estructuras de diversos colorantes.

Crini y col.^{627,628} observaron que para el colorante **133**, que no presenta grupos aniónicos, la presencia o no de aminas terciarias en el polímero no afecta a la capacidad de adsorción del mismo. Sin embargo, para el resto de los colorantes, que sí que poseen estos grupos, se observa un aumento en la capacidad de adsorción en polímeros que contienen grupos amino, siendo este incremento mayor cuanto mayor es el contenido de aminas. Ésto indica que para estos polímeros, además de existir una adsorción física, deben existir otro tipo de interacciones entre los grupos amino y el colorante como interacciones de intercambio iónico o puentes de hidrogeno, que son las responsables de esta mejora en la adsorción. Además, comprobaron que tras circular 250 mL de una disolución de colorante eran suficientes 15mL de una solución agua:etanol (40:60) para desorber el colorante y regenerar el material.

627. Delval, F.; Crini, G.; Morin, N.; Vebrel, J.; Bertini, S.; Torri, G., The sorption of several types of dye on crosslinked polysaccharides derivatives. *Dyes and Pigments* **2002**, 53, (1), 79-92.

628. Delval, F.; Crini, G.; Vebrel, J.; Knorr, M.; Sauvin, G.; Conte, E., Starch-modified filters used for the removal of dyes from waste water. *Macromolecular Symposia* **2003**, 203, 165-171.

Capítulo 6

En base a estos resultados, estos mismos autores han desarrollado polímeros basados en polisacáridos para la eliminación de colorantes catiónicos⁶²⁹⁻⁶³¹. Para tal fin, han llevado a cabo el entrecruzamiento de β -CD con CMC utilizando diferentes agentes de entrecruzamiento, dando lugar a la obtención de polímeros que presentan grupos carboxílicos en su estructura, y han puesto de manifiesto que estos grupos favorecen la adsorción de colorantes catiónicos como los que aparecen en la **figura 6.8**.

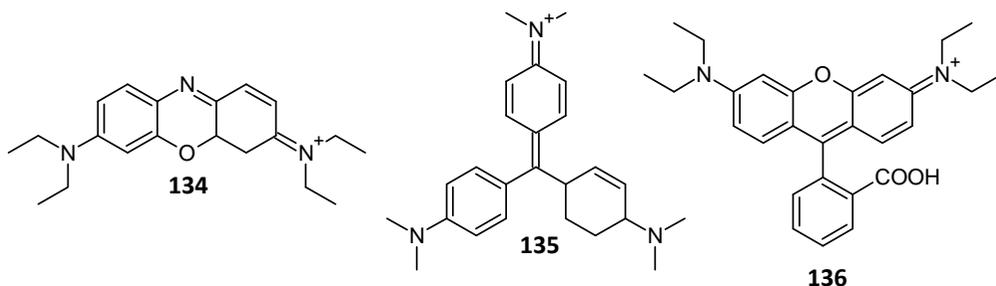


Figura 6.8. Estructura de diversos colorantes catiónicos.

Analizaron la influencia del pH y comprobaron que la capacidad de adsorción incrementa con el pH hasta alcanzar un plató a pH 8. Aunque en el caso anterior no llevaron a cabo un estudio en función del pH en este caso comprobaron la influencia del mismo y pudieron observar que conforme aumenta el pH aumenta la capacidad de adsorción y a partir de pH 8 se alcanza un plató.

El grupo de Yilmaz^{565,632} también ha trabajado en la eliminación de colorantes mediante el empleo de polímeros basados polisacáridos. Utilizan diisocianatos para el entrecruzamiento de β -CD y almidón y ponen de manifiesto su capacidad para la eliminación de colorantes azoicos.

629. Crini, G.; Peindy, H. N.; Gimbert, F.; Robert, C., Removal of Cl Basic Green 4 (Malachite Green) from aqueous solutions by adsorption using cyclodextrin-based adsorbent: Kinetic and equilibrium studies. *Separation and Purification Technology* **2007**, 53, (1), 97-110.

630. Crini, G., Kinetic and equilibrium studies on the removal of cationic dyes from aqueous solution by adsorption onto a cyclodextrin polymer. *Dyes and Pigments* **2008**, 77, (2), 415-426.

631. Crini, G.; Peindy, H. N., Adsorption of Cl Basic Blue 9 on cyclodextrin-based material containing carboxylic groups. *Dyes and Pigments* **2006**, 70, (3), 204-211.

632. Ozmen, E. Y.; Yilmaz, M., Use of beta-cyclodextrin and starch based polymers for sorption of Congo red from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* **2007**, 148, (1-2), 303-310.

Estos polímeros basados en polisacáridos no sólo se han utilizado para la eliminación de contaminantes de diferente naturaleza, sino que también han encontrado aplicación como sistemas de **extracción en fase sólida**. Este tipo de sistemas tienen un gran interés ya que, en ocasiones, los contaminantes se encuentran en concentraciones que, siendo tóxicas, son demasiado pequeñas para ser detectadas por los métodos convencionales de análisis. En estos casos es necesaria una preconcentración para establecer con precisión y exactitud la concentración presente. Así, Radhakrishnan y col.⁶³³ utilizaron polímeros de β -CD para la preconcentración de aminas aromáticas, las cuales son cancerígenas, y Yu y col.⁶³⁴ emplearon polímeros de naturaleza similar para la preconcentración de diversos compuestos aromáticos, como el benceno o derivados del fenol.

6.1.3.2. Eliminación de metales pesados.

Ni el almidón ni las ciclodextrinas tienen capacidad para adsorber o interactuar por sí solas con metales pesados por lo que es necesario introducir grupos que sean capaces de interactuar con ellos, como por ejemplo, grupos aniónicos o grupos que sean capaces de formar complejos de coordinación. Así, Lim y col.⁶³⁵ obtuvieron polímeros capaces de retener metales mediante la succinilación del almidón, utilizando anhídrido succínico en medio básico, o mediante su oxidación con hipoclorito sódico. Estos materiales fueron empleados como adsorbentes de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} y comprobaron que el equilibrio se alcanza en cortos periodos de tiempo (5-10 minutos). Sin embargo, el almidón oxidado es parcialmente soluble en agua y esto constituye un problema. De hecho, en muchas ocasiones lo que se hace es entrecruzar el almidón para conseguir un material totalmente insoluble y después incorporar los grupos que se desean. Siguiendo este esquema, estos mismos autores⁶³⁶, tras entrecruzar el almidón mediante POCl_3 llevaron a cabo su carboximetilación utilizando cloroacetato sódico. Los estudios que realizaron con diferentes metales les permitieron concluir que la

633.Bhaskar, M.; Aruna, P.; Jeevan, R. J. G.; Radhakrishnan, G., beta-cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 509, (1), 39-45.

634.Yu, J. C.; Jiang, Z. T.; Liu, H. Y.; Yu, J. G.; Zhang, L. Z., beta-Cyclodextrin epichlorohydrin copolymer as a solid-phase extraction adsorbent for aromatic compounds in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 477, (1), 93-101.

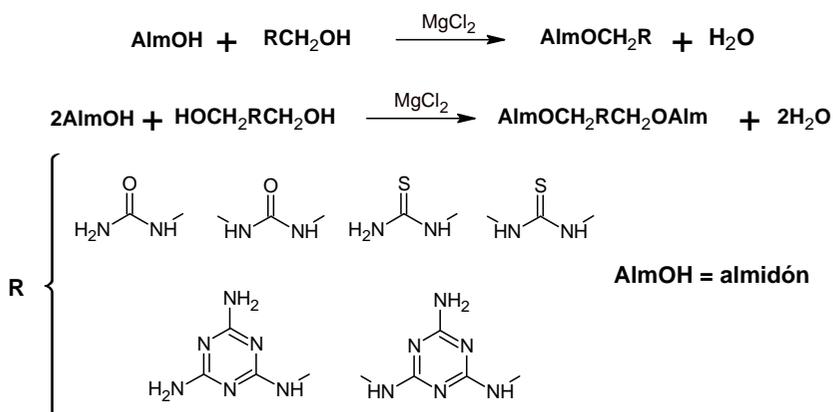
635.Kweon, D. K.; Choi, J. K.; Kim, E. K.; Lim, S. T., Adsorption of divalent metal ions by succinylated and oxidized corn starches. *Carbohydrate Polymers* **2001**, 46, (2), 171-177.

636.Kim, B. S.; Lim, S. T., Removal of heavy metal ions from water by cross-linked carboxymethyl corn starch. *Carbohydrate Polymers* **1999**, 39, (3), 217-223.

Capítulo 6

eficiencia de estos materiales aumenta al aumentar el grado de sustitución de grupos carboximetilo. Además, es posible recuperar el metal adsorbido lavando con una disolución ácida, sin embargo la regeneración del material no es completa y su capacidad se ve afectada por este proceso.

Otro grupo que ha realizado numerosas aportaciones en este campo es el liderado por Khalid. Aunque también han llevado a cabo la obtención de almidones aniónicos, mediante la incorporación de grupos carboxilo⁶³⁷, este grupo se caracteriza por la preparación de almidones neutros capaces de quelatar metales. En concreto han obtenido almidones que contienen grupos urea, tiourea y melanina⁶³⁸ (**esquema 6.2.**), así como grupos amida⁶³⁹. Los materiales obtenidos presentan excelentes capacidades de adsorción y son selectivos frente a Hg^{2+} a pH 0.5-1.



Esquema 6.2. Síntesis de almidones neutros con capacidad para quelatar metales.

Otros grupos funcionales que han sido introducidos en las cadenas de almidón con este mismo fin han sido los grupos amidoxima. Para conseguir esta funcionalización Kettrup y col.⁶⁴⁰ llevaron a cabo la reacción del almidón, previamente entrecruzado, con acrilonitrilo y su posterior derivatización con hidroxilamina en metanol. Mediante esta metodología no sólo consiguieron un

637. Khalil, M. I.; Abdel-Halim, M. G., Preparation of anionic starch containing carboxyl groups and its utilization as chelating agent. *Starch-Starke* **2001**, 53, (1), 35-41.

638. Khalil, M. I.; Abdel-Halim, M. G., Preparation of some starch-based neutral chelating agents. *Carbohydrate Research* **2000**, 324, (3), 189-199.

639. Khalil, M. I.; Farag, S., Utilization of some starch derivatives in heavy metal ions removal. *Journal of Applied Polymer Science* **1998**, 69, (1), 45-50.

640. Zhang, B. W.; Fischer, K.; Bieniek, D.; Kettrup, A., Synthesis of amidoxime-containing modified starch and application for the removal of heavy-metals. *Reactive Polymers* **1993**, 20, (3), 207-216.

material capaz de eliminar metales pesados de disoluciones acuosas sino que, además, el tratamiento con disoluciones de HCl permitía desorber el metal retenido y regenerar el material. Otra estrategia frecuente en bibliografía es la incorporación de grupos xantato⁶⁴¹⁻⁶⁴³. Aunque estos materiales tienen muy buenas propiedades para la eliminación de metales pesados presentan un inconveniente y es que los grupos xantato se degradan lentamente y generan un olor desagradable a azufre durante su almacenamiento y empleo.

También se han obtenido materiales con capacidad para retener metales pesados mediante la reacción del almidón con ácido acrílico^{644, 645} e incluso se han desarrollado polímeros anfotéricos de almidón para la eliminación simultánea de metales pesados y compuestos fenólicos⁶⁴⁶.

Aunque en menor proporción, las CDs también se han utilizado en la eliminación de metales pesados⁶⁴⁷⁻⁶⁴⁹. A partir de materiales obtenidos mediante entrecruzamiento de β -CD con anhídridos, en concreto, con anhídrido succínico en presencia de NaH y con dianhídrido piromelítico.

641.Chaudhari, S.; Tare, V., Removal and Recovery of Heavy Metals from Simulated Wastewater Using Insoluble Starch Xanthate Process. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* **2008**, 12, (3), 170-180.

642.Zhang, L.; Hou, W.; Zhang, L.; Zhang, B., Removal of dissolved heavy metals from industrial wastewater with improved insoluble starch xanthate. *Water Treatment* **1990**, 5, (1), 87-94.

643.Wing, R. E., Dissolved heavy-metal removal by insoluble starch xanthate (ISX). *Environmental Progress* **1983**, 2, (4), 269-72.

644.Abdel-Aal, S. E.; Gad, Y. H.; Dessouki, A. M., The use of wood pulp and radiation-modified starch in wastewater treatment. *Journal of Applied Polymer Science* **2006**, 99, (5), 2460-2469.

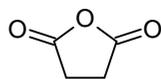
645.Guclu, G.; Guclu, K.; Keles, S., Competitive removal of nickel (II), cobalt (II), and zinc (II) ions from aqueous solutions by starch-graft-acrylic acid copolymers. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 106, (3), 1800-1805.

646.Chan, W. C., Using a water-insoluble amphoteric starch to simultaneously adsorb heavy-metal ions phenol from solutions. *Polymer International* **1995**, 38, (4), 319-323.

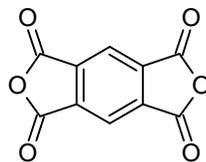
647.Berto, S.; Bruzzoniti, M. C.; Cavalli, R.; Perrachon, D.; Prenesti, E.; Sarzanini, C.; Trotta, F.; Tumiatti, W., Highly crosslinked ionic beta-cyclodextrin polymers and their interaction with heavy metals. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2007**, 57, (1-4), 637-643.

648.Berto, S.; Bruzzoniti, M. C.; Cavalli, R.; Perrachon, D.; Prenesti, E.; Sarzanini, C.; Trotta, F.; Tumiatti, W., Synthesis of new ionic beta-cyclodextrin polymers and characterization of their heavy metals retention. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2007**, 57, (1-4), 631-636.

649.Girek, T.; Kozłowski, C. A.; Kozioł, J. J.; Walkowiak, W.; Korus, I., Polymerisation of beta-cyclodextrin with succinic anhydride. Synthesis, characterisation, and ion flotation of transition metals. *Carbohydrate Polymers* **2005**, 59, (2), 211-215.



**anhídrido
succínico**



**dianhídrido
piromelítico**

Figura 6.9. Anhídridos empleados en el entrecruzamiento de ciclodextrinas.

6.2. Discusión y resultados

6.2.1. Síntesis de polímeros basados en almidón y CDs. Estudios de adsorción de compuestos fenólicos y progesterona.

Las excelentes propiedades que presentan los polímeros de ciclodextrina para la eliminación de contaminantes de naturaleza orgánica de disoluciones acuosas nos animaron a explorar nuevos procedimientos de síntesis de polímeros de CDs utilizando DVS como agente de entrecruzamiento.

Los únicos grupos nucleófilos presentes en las ciclodextrinas son grupos hidroxilo por lo que la polimerización mediante reacción con DVS necesita de un medio fuertemente básico. Elegimos como medio de reacción tampón carbonato 0.5M pH 12 y una estequiometría de un mol de DVS por cada mol de azúcar, es decir, 7 moles de DVS por mol de β -CD. Así, se disolvieron 3 g de β -CD en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 y la disolución se mantuvo bajo agitación magnética a t.a. durante 30 minutos, trascurridos los cuales se adicionaron 2 mL de DVS. Tras 30 minutos comenzó a aparecer un sólido blanco y la agitación se mantuvo durante 2 horas más. Tras las dos horas y media de reacción el sólido se filtró, se lavó con agua hasta pH neutro, con MeOH y por último con éter. El sólido resultante fue secado en una estufa de vacío a 50°C durante 1 día. Al sólido obtenido se le hizo un espectro de ^1H -RMN en DMSO en caliente observándose señales correspondientes al grupo vinilsulfona (**figura 6.10.**).

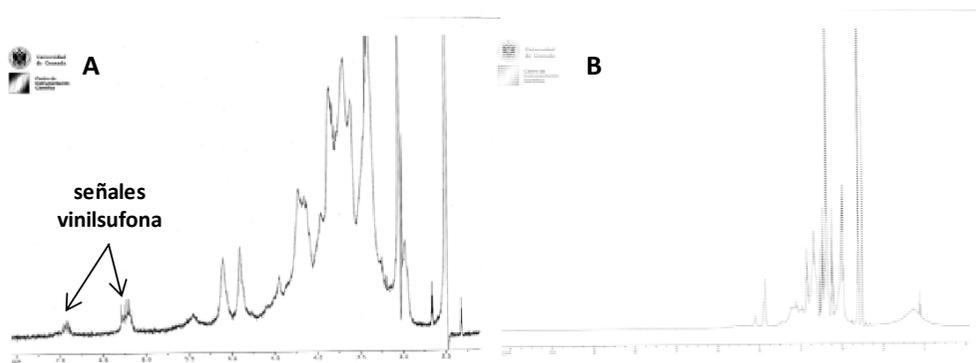


Figura 6.10. (A) Espectro de ^1H -RMN del polímero p β CD (tras 2.5 horas de reacción) en DMSO a 80°C; (B) Espectro de ^1H -RMN del polímero p β CD en DMSO a 80°C tras ser tratado con etanolamina.

Capítulo 6

La reacción de polimerización se repitió aumentando el tiempo hasta 7-8 horas para estudiar si mejoraba el rendimiento y si seguían quedando grupos vinilsulfona, pero el rendimiento no mejoró. El espectro de ^1H -RMN del sólido resultante no mostraba ninguna señal correspondiente al grupo vinilsulfona. Así, se estableció el tiempo óptimo de reacción de 7-8 horas para evitar la presencia de grupos reactivos en los polímeros, y en estas condiciones se llevó a cabo la polimerización de α -CD y almidón.

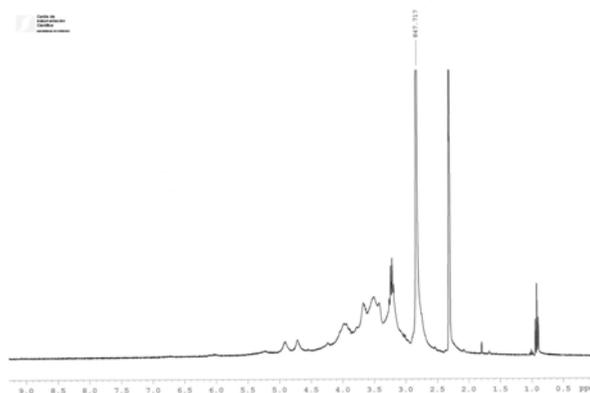


Figura 6.11. Espectro de ^1H -RMN del polímero $p\beta\text{CD}$ (tras 7.5 horas de reacción) en DMSO a 80°C

La polimerización del almidón perseguía una finalidad distinta. El objetivo era obtener un material de referencia de la misma naturaleza que los polímeros de CD que no presentara cavidades y así analizar la influencia de las mismas sobre la adsorción de distintos tipos de compuestos. En el caso del almidón, aunque se utilizó un almidón soluble, en las concentraciones en las que se trabajó no se solubiliza totalmente. Por ello se calentó la suspensión originada al añadir los 3 g de almidón a los 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 a reflujo hasta disolverlo (15-20 minutos). Posteriormente se dejó que la disolución alcanzara la temperatura ambiente antes de adicionar la DVS.

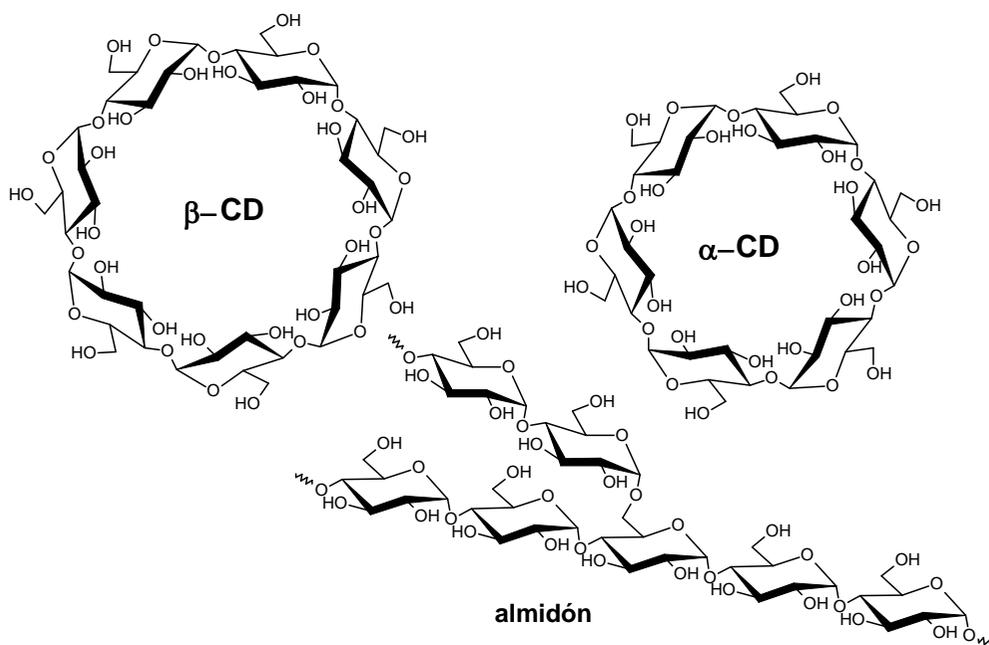


Figura 6.12. Estructura de los oligosacáridos (β -CD y α -CD) y polisacárido (almidón) utilizados en la preparación de los polímeros.

Para estudiar la influencia de la proporción de agente de entrecruzamiento en la adsorción de los materiales sintetizados se prepararon 6 polímeros más con distintas estequiometrías de DVS.

β -CD	DVS:azúcar	gramos polímero	α -CD	DVS:azúcar	gramos polímero
pβCD2	1:2	1.3	pαCD2	1:2	1
pβCD	1:1	3.8	pαCD	1:1	3.6
pβCD0.5	1:0.5	5.4	pαCD0.5	1:0.5	5.2

Almidón	DVS:azúcar	gramos polímero
pA2	1:2	3.7
pA	1:1	4.1
pA0.5	1:0.5	5.3

Tabla 6.2.: Estequiometrías moles de DVS:moles de azúcar utilizadas en las polimerizaciones y cantidad de polímero obtenida para 3 g de polisacárido de partida.

Capítulo 6

En el caso de las CDs, tanto en la β como en la α , al aumentar la cantidad de DVS en lugar de formarse un sólido blanco se formó un bloque que fue necesario tritular para obtener un sólido con el que trabajar. Al disminuir la cantidad de DVS disminuyó considerablemente el rendimiento de la polimerización de manera que a partir de 3 g de α -CD sólo se obtuvo 1 g de polímero y en el caso de la β -CD 1.3 g de polímero. Para el almidón la cantidad de DVS utilizada afecta al rendimiento de la reacción, aunque no en la medida en la que lo hace con las CDs. La cantidad de DVS utilizada no modifica el aspecto macroscópico de los polímeros de almidón, en todos los casos se obtiene un sólido que se puede filtrar y con el que se puede trabajar directamente.

Para analizar si la proporción de DVS utilizada en la polimerización repercute sobre la capacidad de adsorción de los materiales obtenidos se llevaron a cabo una serie de estudios en solución con los compuestos aromáticos modelo fenol y el 4-nitrofenol considerados contaminantes. Un paso previo para el análisis de la capacidad de adsorción es el estudio de la cinética del proceso. A tal fin se prepararon dos disoluciones de 100 ppm en agua Milli-Q, una de fenol y otra de 4-nitrofenol, y se pusieron en contacto (10 mL) con 100 mg de los polímeros **pA**, **p β CD** y **p α CD**. Cada cierto tiempo se midió la concentración que quedaba en solución y se concluyó que el equilibrio se alcanzaba en 15-30 minutos.

Una vez establecida la cinética del proceso las capacidades de adsorción de los polímeros sintetizados se estudiaron incubando 100 mg de polímero con 10 mL de disoluciones de concentraciones crecientes de fenol y 4-nitrofenol (20-5000 ppm). Las suspensiones resultantes se mantuvieron con agitación orbital a 180 rpm durante 2 horas. Trascurrido ese tiempo todas las disoluciones, tanto las de partida como las tratadas con los polímeros se filtran utilizando un filtro de jeringa de celulosa regenerada y su concentración se determina mediante absorción UV-Vis. Los resultados se resumen en la **figura 6.13**.

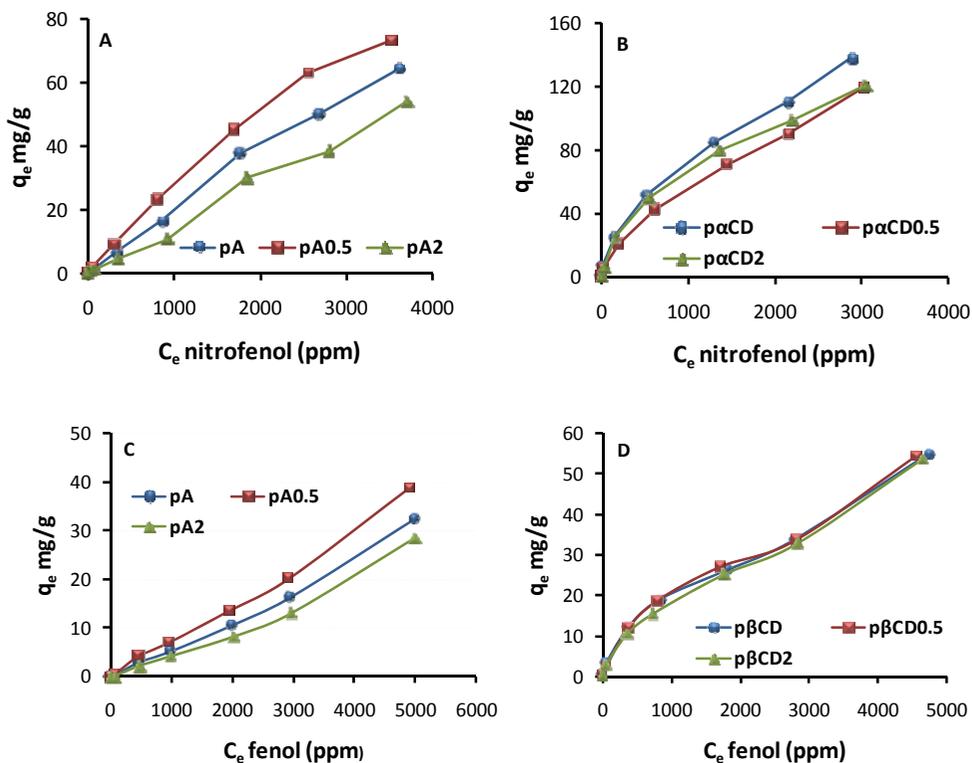


Figura 6.13. Capacidad de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) frente a la concentración de soluto en equilibrio (en ppm). **A)** 4-nitrofenol-polímeros almidón; **B)** 4-nitrofenol-polímeros α-CD; **C)** fenol-polímeros almidón; **D)** fenol-polímeros β-CD.

Se observa que la influencia de la proporción de DVS es más acusada para los polímeros de almidón que para los polímeros obtenidos a partir de ciclodextrinas. Para el almidón, tanto para el fenol como para el 4-nitrofenol, al aumentar la proporción de agente de entrecruzamiento aumenta la capacidad de adsorción del material obtenido. Este hecho también es observado por Crini y col.⁵³⁹ quienes razonan que este incremento es debido a un aumento en el grado de entrecruzamiento que provoca una mayor reticulación en la red del polímero dando lugar a una mejor interacción con el soluto.

En el caso de la β y α-CD el comportamiento difiere del observado para el almidón. Para el fenol prácticamente no hay diferencias entre uno y otro polímero y para el 4-nitrofenol, aunque sí se observan diferencias, éstas son mucho menos significativas que para el almidón y la tendencia es diferente: los polímeros que presentan una capacidad de adsorción ligeramente superior son los preparados

Capítulo 6

con una cantidad de DVS media, es decir con un mol de DVS por mol de unidad de azúcar.

A raíz de estos resultados, y dado que para las CDs es ventajoso trabajar con una proporción DVS:azúcar 1:1, pues para la proporción 1:2 el rendimiento es muy bajo y para la 1:0.5 el procesado del polímero es más complejo, decidimos continuar trabajando con los polímeros obtenidos en estas condiciones y explorar la obtención de polímeros mixtos almidón-CD. Para la síntesis de los polímeros mixtos se procedió de la siguiente manera: 1.5 g de almidón se disolvieron en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 y se calentó a reflujo para favorecer su disolución. Una vez que la disolución alcanzó la temperatura ambiente se adicionaron 1.5g de CD (α o β) y la disolución resultante se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos, transcurridos los cuales se adicionaron 2 mL de DVS. Aproximadamente tras 20 minutos de reacción empezó a precipitar el polímero, y como en el resto de los casos la agitación se mantuvo durante 7-8 horas antes de filtrar y lavar el sólido obtenido.

polímero	polisacárido que contiene
pA	almidón
p β CD	β -CD
p α CD	α -CD
pA β CD	almidón- β CD
pA α CD	almidón- α CD

Tabla 6.3. Polímeros sintetizados y polisacáridos que contienen.

Para los polímeros mixtos se analizó la cinética del proceso y se concluyó, de nuevo, que el equilibrio se alcanza en cortos periodos de tiempo (15-30 minutos) Se estudiaron las capacidades de adsorción de fenol y 4-nitrofenol. Los resultados se recogen en las **tablas 6.4.** y **6.5.** donde se resumen las capacidades q_e de cada uno de los polímeros, expresadas en mg de contaminante/g de polímero, a las diferentes concentraciones iniciales con las que se trabajó.

C_o (ppm) fenol	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
20	0.04	0.88	1.41	0.46	0.77
100	0.35	3.60	5.65	2.09	3.16
500	2.97	12.42	18.34	8.34	10.61
1000	5.13	19.15	22.33	13.54	15.61
2000	10.48	26.35	31.44	21.18	25.24
3000	16.31	33.66	37.57	31.07	32.85
5000	32.33	54.92	60.67	50.64	53.44

Tabla 6.4. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) de fenol para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de fenol (2.5 horas de agitación a 22°C).

C_o (ppm) nitrofenol	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
20	0.32	1.33	1.62	1.06	1.36
100	1.49	5.67	7.49	4.42	5.65
500	7.01	19.68	25.89	15.87	18.44
1000	16.84	43.20	51.85	27.09	32.41
2000	38.07	77.74	85.06	54.51	55.38
3000	50.32	105.43	110.00	74.55	74.61
5000	64.43	137.51	143.10	107.56	109.29

Tabla 6.5. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g polímero) de 4-nitrofenol para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de 4-nitrofenol (2.5 horas de agitación a 22°C).

Los resultados muestran que todos los polímeros presentan mejores propiedades para el 4-nitrofenol que para el fenol. Para ambos contaminantes el polímero que proporciona mejores resultados es el polímero de α-CD (pαCD) y el que presenta las capacidades de adsorción más bajas es el de almidón (pA). En general, los polímeros constituidos exclusivamente por ciclodextrinas (pβCD y pαCD) proporcionan mejores resultados que los mixtos (pAβCD y pAαCD) y las capacidades de los que contiene α-CD son mayores que los que contienen β-CD. Un hecho reseñable es que las diferencias son más notables cuanto menor es la concentración de la disolución de partida.

Existen gran número de isothermas de adsorción, pero para el análisis de los datos experimentales obtenidos en este trabajo se han empleado tres: la isoterma de Langmuir, la de Freundlich y la de Langmuir-Freundlich, pues son las más comunes. El modelo de Langmuir se basa en la existencia de una monocapa de adsorción constituida por sitios de adsorción finitos y uniformemente distribuidos

Capítulo 6

donde las moléculas adsorbidas en puntos colindantes no interaccionan entre sí. La ecuación que describe el modelo es:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{\alpha_L}{K_L} C_e$$

Ecuación 6.1.

Donde q_e es la concentración en equilibrio del soluto en el polímero (mg/g), C_e es la concentración en equilibrio del soluto en solución (ppm) K_L (L/g) y α_L (L/mg) son dos constantes y el cociente K_L/α_L nos da el valor de q_{\max} , que es la capacidad máxima de adsorción (mg/g).

El modelo de Freundlich, a diferencia del de Langmuir, es un modelo empírico para adsorbentes con sitios de unión heterogéneos y viene descrito por la siguiente ecuación:

$$q_e = K_F C_e^m$$

Ecuación 6.2.

Donde K_F es la constante de equilibrio de Freundlich, la cual está relacionada con la capacidad del material y la afinidad media de los centros de adsorción. El parámetro m ha sido descrito según diferentes interpretaciones. Para algunos autores se trata de un índice de heterogeneidad que se aproxima a 1 conforme esta disminuye⁶⁵⁰, mientras que para otros es una constante empírica relacionada con la eficiencia de la adsorción⁵³⁹, de manera que si $m > 1$ la adsorción es baja y si $m < 1$ la adsorción es buena.

El modelo de Langmuir-Freundlich no es más que un compendio de los dos anteriores que viene descrito por la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{N_t K_o^m C_e^m}{1 + K_o^m C_e^m}$$

Ecuación 6.3.

650. Garcia-Calzon, J. A.; Diaz-Garcia, M. E., Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators, B Chemical* **2007**, B123, (2), 1180-1194.

Donde N_t es el número total de sitios de unión y, por lo tanto, se encuentra relacionado con la capacidad máxima del material, y $K_0 = K_F^{1/m}$.

Para todos los polímeros y ambos compuestos, fenol y 4-nitrofenol, los datos experimentales se ajustan mejor a la ecuación de Freundlich. En la siguiente representación gráfica (**figura 6.14.**) se muestran los valores experimentales del $\ln C_e$ frente a $\ln q_e$, que es la forma de linealizar la ecuación de Freundlich, así como el ajuste lineal de los mismos a la ecuación de Freundlich para el 4-nitrofenol y los distintos polímeros.

$$\ln q_e = \ln K_F + m \ln C_e$$

Ecuación 6.4.

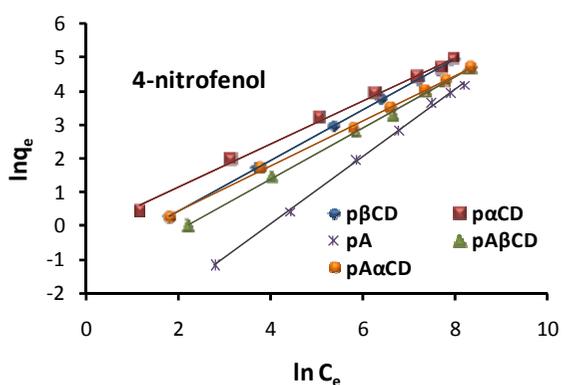


Figura 6.14. Ajustes a la isoterma de adsorción de Freundlich para los distintos polímeros ensayados.

		pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
fenol	m	1.127	0.663	0.536	0.801	0.692
	$K_F \times 10^3$	2.15	199.15	623.02	56.07	146.4
4-nitrofenol	m	1.001	0.754	0.635	0.758	0.666
	$K_F \times 10^3$	19.11	340.02	902.19	193.44	404.51

Tabla 6.6. Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

En general, para ambas series (fenol y 4-nitrofenol) se observa un aumento en la constante de Freundlich al aumentar la capacidad de adsorción y, además, una disminución en el valor m lo cual esta de acuerdo con la interpretación que le dan a este parámetro Crini y col⁵³⁹ quienes lo relacionan con la capacidad de adsorción del sistema en estudio.

Capítulo 6

Se amplió el estudio a otros modelos de contaminantes de naturaleza fenólica tales como el β -naftol y el bisfenol A.

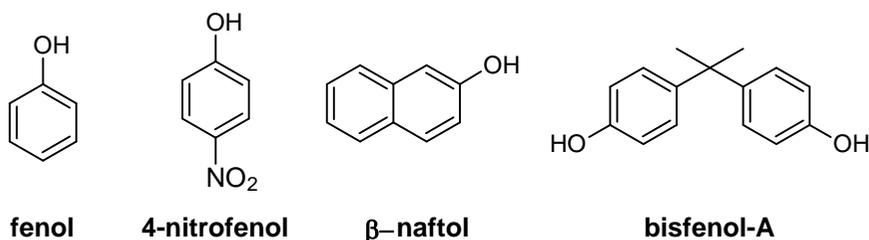


Figura 6.15. Estructura de los distintos contaminantes modelo de naturaleza fenólica que se han utilizado.

En el caso del β -naftol y el bisfenol A no fue posible preparar una disolución concentrada de los mismos (1000 ppm) en agua, por lo que se prepararon en agua al 10% metanol (mínima cantidad necesaria para solubilizarlos). Además, para estudiar la influencia que ejercía el MeOH se prepararon otras disoluciones tanto de β -naftol, como de bisfenol A en agua al 10% de DMSO.

Los resultados se resumen en las **tablas 6.7.** y **6.8.**

Tabla 6.7. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) de β -naftol en agua-

C₀ (ppm)					
β-naftol	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
MeOH 10%					
20	0.77	1.87	1.89	1.34	1.12
50	2.06	3.82	3.87	3.12	2.87
100	3.99	7.15	7.23	5.70	5.51
250	10.87	16.37	16.91	14.22	13.67
500	18.64	27.82	28.53	20.48	20.29
1000	37.94	52.23	53.65	39.36	39.03
m	0.984	0.686	0.689	0.723	0.806
K_F x 10³	66.49	725.81	752.01	390.59	240.91

MeOH (10%) para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de β -naftol (2.5 horas de agitación a 22°C). Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

C_o (ppm) β-naftol DMSO 10%	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
20	0.51	1.25	1.30	1.00	0.83
50	1.26	3.10	3.35	2.32	2.14
100	2.71	5.88	6.40	4.17	4.29
250	6.60	12.57	14.13	9.58	9.70
500	11.42	22.59	25.19	17.05	16.70
1000	21.19	40.45	43.90	32.07	30.37
m	0.936	0.770	0.775	0.811	0.863
K_F x 10³	43.20	309.46	360.69	161.12	117.21

Tabla 6.8. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) de β-naftol en agua-DMSO (10%) para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de β-naftol (2.5 horas de agitación a 22°C). Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

La tendencia que se observa es muy parecida a la encontrada para el fenol y el 4-nitrofenol. Los que mejores propiedades presentan son los polímeros de CD (**pβCD** y **pαCD**), seguidos por los polímeros mixtos almidón-CD (**pAβCD** y **pAαCD**) y por último el de almidón (**pA**) es el que presenta peores propiedades de adsorción. Sin embargo, en este caso se observa una reducción en las diferencias existentes entre las capacidades de adsorción de los polímeros que contienen β-CD y los que contienen α-CD. Otro hecho a destacar son las diferencias que se observan entre los dos disolventes utilizados, siendo mejores los resultados que se obtienen para el MeOH que para el DMSO. Lo cual no es de extrañar pues el DMSO es un disolvente con una mayor capacidad de solubilización y en ese medio el β-naftol debe encontrarse más “cómodo”.

En el caso del bisfenol A los resultados obtenidos se muestran en las **tablas 6.9. y 6.10.**

C_o (ppm) Bisfenol A MeOH 10%	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
20	0.90	1.82	1.44	1.83	1.24
50	2.55	4.68	3.68	4.81	3.76
100	5.03	9.12	7.19	9.40	6.52
250	12.45	21.96	18.29	22.65	17.05
500	25.39	35.68	31.66	38.28	30.72
1000	54.90	58.40	56.90	63.73	55.11
m	1.087	0.644	0.859	0.649	0.938
K_F x 10³	57.49	1417.27	339.58	1631.89	199.71

Tabla 6.9. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) de bisfenol-A en agua-MeOH (10%) para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de bisfenol A (2.5 horas de agitación a 22°C). Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

C_o (ppm) Bisfenol A DMSO 10%	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
20	0.59	1.80	1.22	1.57	1.08
50	1.84	4.48	3.15	4.37	2.50
100	3.65	8.44	5.95	8.67	5.12
250	9.44	18.58	14.94	19.96	12.66
500	18.97	31.41	27.66	33.61	23.05
1000	37.95	54.73	51.40	58.65	45.78
m	1.078	0.685	0.938	0.774	0.952
K_F x 10³	32.99	865.44	159.15	598.50	105.48

Tabla 6.10. Capacidades de adsorción (en mg de contaminante/g de polímero) de bisfenol-A en agua-DMSO (10%) para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de bisfenol A (2.5 horas de agitación a 22°C). Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

Al igual que en el caso anterior se mantiene la tendencia en lo referente al medio utilizado, es decir, con MeOH las capacidades de adsorción son mayores y el almidón es el que presenta los valores de adsorción más bajos. Sin embargo la tendencia observada hasta el momento para el resto de los polímeros ha cambiado. Ahora los mejores resultados los proporcionan los polímeros que contienen β-CD y apenas existen diferencias entre los polímeros mixtos y los constituidos únicamente por CDs. Estos datos indican que la cavidad de las CDs afecta significativamente a los procesos de adsorción. De ahí que las propiedades de los polímeros que contiene β-CD mejoren con respecto a los que contiene α-CD

al aumentar el tamaño del contaminante, ya que la cavidad de la β -CD es mayor que la de la α -CD (6.0-6.5 y 4.7-5.3Å de diámetro respectivamente).

Al igual que ocurría para el fenol y el 4-nitrofenol, los datos experimentales se ajustan muy bien a la isoterma de Freundlich, y de nuevo se observa un aumento en la constante de Freundlich (K_F) y una disminución del parámetro m (pendiente) al aumentar la capacidad de absorción del material (**figura 6.16 y tablas 6.7., 6.8., 6.9. y 6.10.**)

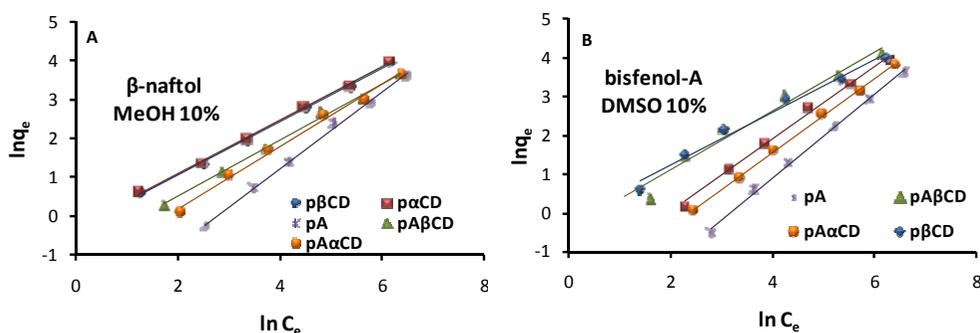


Figura 6.16. Ajustes a la isoterma de adsorción de Freundlich para los distintos polímeros ensayados **A)** β -naftol en agua-MeOH (10%); **B)** bisfenol A en agua-DMSO (10%).

Si comparamos las capacidades de los distintos polímeros para retener a los compuestos fenólicos ensayados entre si nos encontramos que para todos los polímeros el orden que se observa es el mismo: **fenol>4-nitrofenol> β -naftol>bisfenol A**. Este aumento en la capacidad de adsorción es más acusado en el caso de los polímeros de almidón y los que contienen β -CD que en el caso de los que se obtienen a partir de α -CD. Esto nos está indicando que las capacidades de adsorción dependen tanto del polímero utilizado como del compuesto en estudio.

Dado el interés que presenta el transporte de fármacos⁶⁵¹, fundamentalmente en lo que respecta a la biodisponibilidad, se consideró oportuno estudiar el comportamiento de estos materiales frente a compuestos de naturaleza esteroidea. Se seleccionó la progesterona como modelo de fármaco de esta naturaleza. Dada su baja solubilidad en agua se trabajó con soluciones en MeOH al 10%, ya que como acabamos de describir da mejores resultados que el DMSO. En estas condiciones la máxima solubilidad que

⁶⁵¹Uekama, K., Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, 52, (8), 900-915.

Capítulo 6

conseguimos alcanzar fue de 50 ppm. Al igual que en el resto de solutos utilizados se pesaron 100 mg de cada uno de los polímeros y se les adicionaron 10 mL de cada una de las disoluciones preparadas. La suspensión se agitó en un agitador orbital a 180 rpm durante 2.5 horas, tiempo suficiente para que se alcance el equilibrio. Los resultados obtenidos se recogen en la **tabla 6.11**.

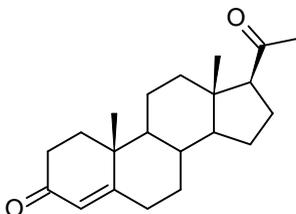


Figura 6.17. Estructura de la progesterona.

C_o (ppm) progesterona MeOH 10%	pA	pβCD	pαCD	pAβCD	pAαCD
5	0.22	0.33	0.19	0.37	0.21
10	0.45	0.69	0.43	0.79	0.47
20	0.86	1.35	0.76	1.50	0.78
30	1.22	1.91	1.07	2.17	1.10
40	1.53	2.38	1.44	2.79	1.47
50	1.94	2.79	1.64	3.27	1.82
m	0.807	0.818	0.894	0.823	0.820
K_F x 10³	129.58	291.83	84.98	442.24	115.71

Tabla 6.11. Capacidades de adsorción (en mg de progesterona/g de polímero) de progesterona en agua-MeOH (10%) para los polímeros de almidón y ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de progesterona (2.5 horas de agitación a 22°C). Parámetros de Freundlich obtenidos mediante ajuste lineal por mínimos cuadrados.

El comportamiento de los materiales sintetizados hacia la progesterona varía sensiblemente del observado hasta el momento para los compuestos fenólicos. En este caso la pobre capacidad de adsorción del almidón es compartida por los polímeros que contiene α-CD (**pαCD** y **pAαCD**). Los polímeros que son capaces de retener mayores cantidades de progesterona son los polímeros derivados de la β-CD, siendo el mejor el polímero mixto **pAβCD**. Al igual que en los casos anteriores los datos experimentales se ajustan muy bien a la isoterma de Freundlich (**figura 6.18.**). En este caso, a diferencia de lo que ocurría para los contaminantes de naturaleza fenólica, el valor de m (pendiente de la

representación) apenas varía de un material a otro, tal y como se muestra en la **figura 6.18**. Sin embargo, la constante de Freundlich sí que aumenta al aumentar la capacidad de adsorción de los mismos.

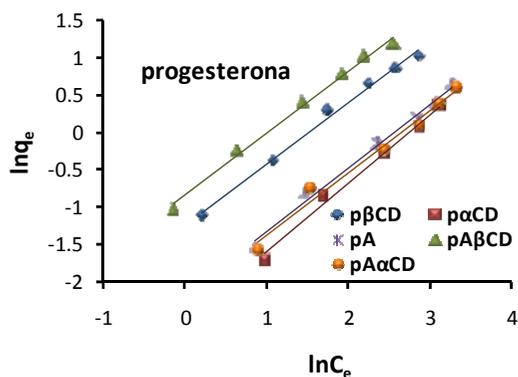


Figura 6.18. Ajustes a la isoterma de adsorción de Freundlich para los distintos polímeros ensayados.

6.2.2. Síntesis de polímeros aniónicos de almidón y dextrina. Estudios de adsorción de metales.

Los buenos resultados de los polímeros sintetizados en el apartado anterior nos animaron a funcionalizarlos con grupos que le confirieran carga, en concreto carga negativa, para utilizarlos en la eliminación de metales pesados de soluciones acuosas.

En las condiciones en las que se lleva a cabo el entrecruzamiento del almidón y las ciclodextrinas la DVS es capaz de reaccionar con otros nucleófilos, como aminas o tioles. Este hecho nos llevó a explorar la posibilidad de entrecruzar el almidón en presencia de un ácido carboxílico sencillo que presentase a su vez un grupo nucleófilo capaz de reaccionar con la DVS. En un principio se pensó en el empleo de un aminoácido como la glicina o un ácido carboxílico de cadena más larga como el ácido γ -aminobutírico (GABA). Las condiciones de reacción fueron análogas a las descritas para los polímeros anteriores: 1 mol de DVS por 1 mol de azúcar (monosacárido) a los que se añadió 1 mol de ácido carboxílico. Para la obtención de estos materiales decidimos no utilizar las CDs ya que el almidón es un material mucho más económico y en este caso sólo nos interesa como soporte para unir las cargas.

En un primer intento, a 3 g de almidón disueltos en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 se le adicionaron 1.4 g de glicina. La disolución resultante se

Capítulo 6

mantuvo bajo agitación durante 30 minutos y a continuación se añadieron 2 mL de DVS. Sin embargo, no apareció ningún sólido, incluso tras un día de reacción. Esto puede ser debido a la mayor reactividad de las aminas frente a vinilsulfonas en comparación con los grupos hidroxilo. Además, las aminas primarias reaccionan con la DVS dando lugar al heterociclo tiomorfolina 1,1'-dióxido, sin que se aísle, en ningún caso, el producto de monoación. Así, aunque tengamos un medio fuertemente básico en el que los grupos hidroxilos son muy reactivos la reacción con las aminas probablemente está cinéticamente favorecida por lo que consume la DVS e impide que se produzca el entrecruzamiento y la consecuente formación del polímero.

Cuando se llevó a cabo la síntesis del primer polímero de CD se comprobó, por $^1\text{H-RMN}$ (**figura 6.10.**), la presencia de grupos vinilsulfona para cortos periodos de polimerización (2.5 horas), grupos que podrían reaccionar con el grupo amino de la glicina y permitirían la incorporación de este ácido a la estructura del polímero. Este hecho nos indujo a ensayar una estrategia diferente basada en iniciar la polimerización del almidón en las mismas condiciones utilizadas hasta el momento y adicionar el ácido una vez ha comenzado la formación del mismo. Así, transcurridos 15 minutos desde la adición de la DVS comienza la precipitación del polímero y tras otros 15 minutos bajo agitación se adicionaron 1.4 g de glicina. Al igual que en el caso de los polímeros sin carga se mantuvo la suspensión bajo agitación a t.a. un total de 7-8 horas desde la adición de la DVS. A continuación el sólido se filtró, se lavó con agua hasta pH neutro, y después con MeOH y éter. El sólido resultante se secó en una estufa de vacío a 50°C. Utilizando estas mismas condiciones también se llevó a cabo la reacción con GABA.

Dado que las vinilsulfonas también son capaces de reaccionar con grupos tiol y con aminas secundarias se llevó a cabo la polimerización en presencia de ácido tioacético y de ácido iminodiacético. En este último caso por cada amino que reacciona se introducen dos grupos carboxílicos.

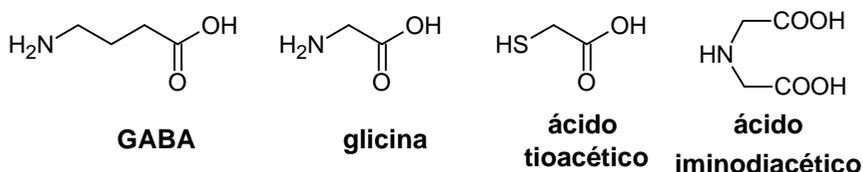


Figura 6.19. Ácidos empleados en la síntesis de los polímeros de almidón aniónicos.

En la **tabla 6.12.** se recogen los distintos polímeros con el ácido carboxílico que se ha utilizado en su síntesis:

polímero	ácido que contiene
pAGABA	GABA
pAGly	glicina
pATA	ácido tioacético
pAIDA	ácido iminodiacético

Tabla 6.12. Polímeros de almidón sintetizados y ácidos utilizados en su preparación.

Para estudiar la capacidad de estos materiales en la eliminación de metales pesados de disoluciones acuosas se eligieron tres metales modelo contaminantes de aguas, el Cr^{3+} , el Pb^{2+} y el Cd^{2+} . En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la influencia del pH sobre la adsorción para lo cual se prepararon disoluciones de 50 ppm de cada uno de los metales a partir de una disolución patrón de 1000 ppm en HNO_3 al 1%. En todos los casos la disolución resultante tenía un pH en torno a 2 y se modificó mediante la adición de NaOH al 10%. En el caso del Cr^{3+} y el Cd^{2+} se prepararon disoluciones hasta pH 6 ya que por encima de este pH el metal precipita. En el caso del Pb^{2+} sólo fue posible llegar hasta pH 5 ya que en este caso la precipitación del metal comienza a un pH más bajo. Para el Cr^{3+} y el Pb^{2+} se pesaron 50 mg del polímero **pAGABA** y se le adicionaron 20 mL de cada una de las disoluciones preparadas a los diferentes pHs. En el caso del Cd^{2+} el polímero que se utilizó fue el **pAGly**. En todos los casos la disolución se mantuvo bajo agitación a una velocidad de 180 rpm utilizando un agitador orbital. En las siguientes gráficas (**figura 6.20.**) se recogen los mg de metal retenidos por gramo de polímero a los diferentes pHs de trabajo.

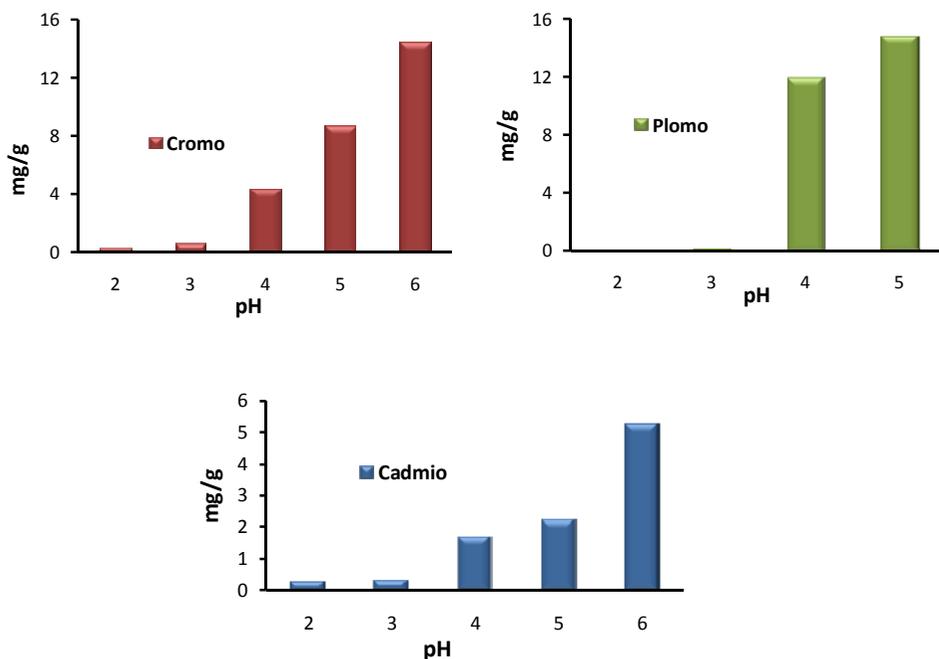


Figura 6.20. Efecto del pH sobre la capacidad de adsorción de Cr^{3+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} de los polímeros aniónicos de almidón.

Como muestra la **figura 6.20.**, en todos los casos se produce un aumento en la cantidad de metal retenido sobre el polímero al aumentar el pH, hecho que es observado por otros grupos que trabajan con materiales de naturaleza similar^{635,639, 644-646}. Al tener grupos ionizables (grupos carboxilo) en la estructura del polímero el grado de ionización se ve afectado por el pH, lo que repercute en la capacidad de los mismos para retener iones metálicos. A pH bajos (2-3) los grupos carboxilo se encuentran en forma no ionizada que no es capaz de interaccionar con los iones metálicos. A medida que se incrementa el pH aumenta el grado de ionización y por lo tanto la probabilidad de que los grupos carboxilo interaccionen con los iones metálicos presentes en solución. De manera que, **para las condiciones ensayadas**, el pH óptimo de trabajo es 6 para el Cr^{3+} y el Cd^{2+} y 5 para el Pb^{2+} .

Una vez fijado el pH óptimo de trabajo se llevó a cabo un estudio de adsorción en función del tiempo para establecer el momento en el que se alcanza el máximo de adsorción. Se pesaron 75 mg de cada uno de los polímeros con los que se trabajó y se les adicionaron 40 mL de una disolución de 50 ppm al pH óptimo de trabajo para cada metal (pH 6 para Cr^{3+} y Cd^{2+} y pH 5 para Pb^{2+}). En el

caso del Pb^{2+} y el Cr^{3+} se trabajó con los polímeros **pAGABA**, **pAGly** y **pATA** y para el Cd^{2+} se utilizaron los polímeros **pAGly**, **pATA** y **pAIDA**. En todos los casos, una vez adicionados los 40 mL de la disolución de metal, las suspensiones se mantuvieron con agitación orbital (180 rpm) y cada cierto tiempo se fueron tomando alícuotas de 1.5-2 mL. En la **figura 6.21**. se muestra la evolución de la concentración de metal en solución en función del tiempo y del polímero estudiado.

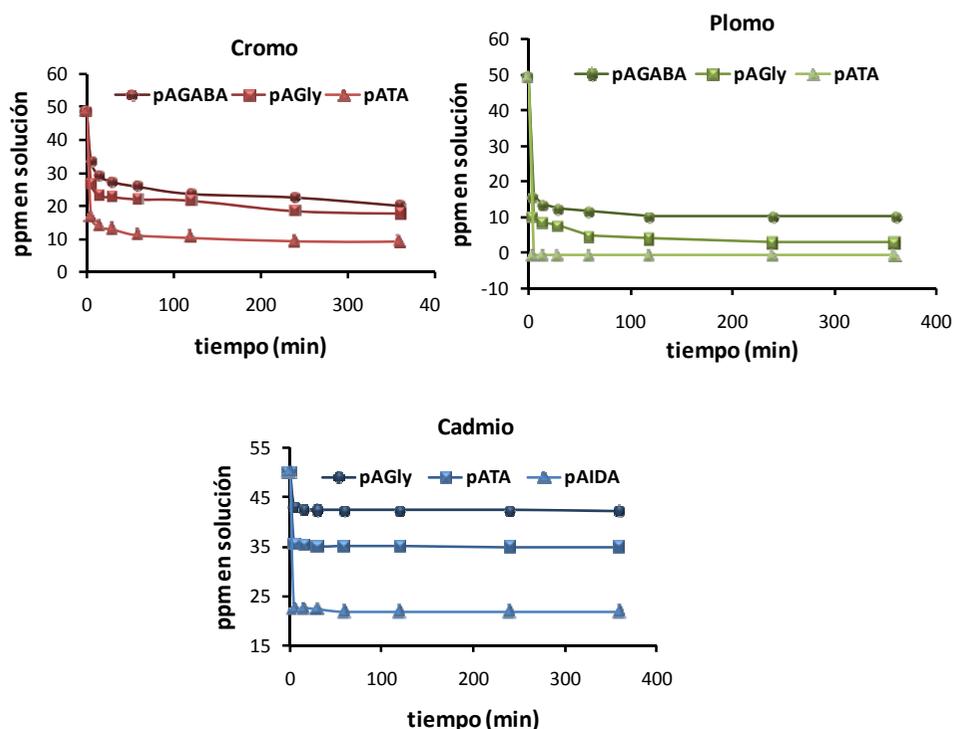


Figura 6.21. Evolución de la concentración de metal en solución en función del tiempo para los polímeros estudiados.

Aunque para todos los metales el equilibrio se alcanza rápidamente, en el caso del Cd^{2+} en 5 minutos los polímeros ensayados superan el 95% de su capacidad máxima en las condiciones de trabajo, para el Pb^{2+} se necesitan 15 minutos para alcanzar este porcentaje y para el Cr^{3+} se requiere incluso algo más de tiempo. En cualquier caso el equilibrio se alcanza en cortos periodos de tiempo. Tanto para el Pb^{2+} como para el Cr^{3+} la tendencia es **pATA**>**pAGly**>**pAGABA** y en el caso del Cd^{2+} **pAIDA**>**pATA**>**pAGly**, lo cual nos lleva a concluir que en principio los polímeros obtenidos a partir de ácido tioacético y ácido iminodiacético son los que presentan una mayor capacidad de adsorción.

Para estudiar la influencia del polisacárido que actúa como soporte sobre la capacidad de retención de estos materiales se seleccionó la dextrina, la cual se obtiene a partir del almidón por hidrólisis y, a diferencia de éste, es perfectamente soluble en las condiciones de reacción. Al igual que anteriormente se disolvieron 3 gramos de dextrina en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12, la disolución resultante se mantuvo bajo agitación 30 minutos tras los cuales se adicionaron 2 mL de DVS. A partir de los 10-15 minutos empezó a aparecer un precipitado y a los 30 minutos, igual que en el caso del almidón, se le adicionó el ácido correspondiente. Para este polisacárido sólo se llevó a cabo la síntesis con el ácido tioacético y con el ácido iminodiacético que, de acuerdo con los resultados de retención de Cr^{3+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} , parecen ser los que proporcionan mayores capacidades de adsorción.

Se llevó a cabo el estudio comparativo de la capacidad de todos los polímeros sintetizados para retener los tres metales modelo seleccionados, para lo cual se preparó una disolución de 50 ppm de cada uno de los metales y se ajustó al pH óptimo de trabajo. Se pesaron 50 mg de cada uno de los polímeros para cada metal así como 50 mg del polímero de almidón sin funcionalizar **pA** y se les adicionaron 40 mL de cada una de las disoluciones preparadas. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital (180 rpm) durante una noche. En el siguiente gráfico (**figura 6.22.**) se representan los resultados obtenidos, para los tres metales y para todos los polímeros, expresados en mg de metal por gramo de polímero.

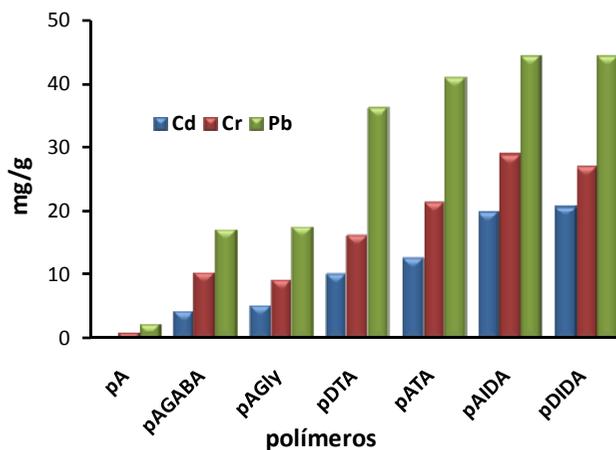


Figura 6.22. Comparación de las capacidades de adsorción (en mg de metal/g de polímero) de Cr^{3+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} , para el polímero de almidón **pA** y los polímeros aniónicos sintetizados, obtenidas a partir del tratamiento de 40 mL de una disolución de metal de 50 ppm con 50 mg de polímero.

polímero	polisacárido	ácido	Cr mg/g	Pb mg/g	Cd mg/g
pA	almidón	no	0.9	2.2	0.6
pAGABA	almidón	GABA	10.4	17.1	4.4
pAGly	almidón	glicina	9.3	17.6	5.3
pATA	almidón	tioacético	21.4	40.9	12.5
pDTA	dextrina	tioacético	16.3	36.1	10.3
pAIDA	almidón	iminodiacético	29.0	44.3	19.9
pDIDA	dextrina	iminodiacético	27.1	44.3	20.7

Tabla 6.13. Capacidades de adsorción (en mg de metal /g de polímero) de Cr^{3+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} , para el polímero de almidón **pA** y los polímeros aniónicos sintetizados, obtenidas a partir del tratamiento de 40 mL de una disolución de metal de 50 ppm con 50 mg de polímero.

Para caracterizar estos nuevos materiales se determinó el contenido de grupos ácido que presentan, los cuales se resumen en la **tabla 6.14**.

grupos ácidos	pAGABA	pAGly	pATA	pDTA	pAIDA	pDIDA
$\mu\text{eq/g de polímero}$	202	227 196	357 388	328	325	361

Tabla 6.14. Grupos ácido de los diferentes polímeros. En el caso del **pAGly** y **pATA** la síntesis se llevó cabo por duplicado y se determinaron los grupos ácido en ambos casos.

La capacidad de adsorción del almidón sin funcionalizar es muy baja si la comparamos con el resto de los polímeros sintetizados (**figura 6.22.** y **tabla 6.13.**), lo que indica que la interacción polímero-metal presenta una importante componente electrostática, como cabía esperar. Haciendo uso del mismo ácido los polímeros de almidón parecen dar mejores resultados aunque las diferencias no son suficientemente significativas, por lo que el soporte utilizado, almidón o dextrina, no parece ejercer una gran influencia sobre la capacidad de adsorción del material. Sin embargo, la naturaleza del ácido carboxílico sí influye, más concretamente el grupo nucleófilo que éste contiene. Así, los que peores resultados son los correspondientes a ácidos carboxílicos que contienen un grupo amino primario, es decir la glicina y el GABA, después el tioacético y por último el que proporciona las capacidades de adsorción más altas es el iminodiacético.

La **tabla 6.14.** muestra que los polímeros **pAGABA** y **pAGly** son los que presentan una menor densidad de grupos ácido, lo que explica que sean los que menores capacidades de adsorción presentan. Sin embargo, tanto los polímeros que contienen ácido tioacético como los que contienen ácido iminodiacético presentan un número de grupos ácido muy similar. De manera que, aunque en la retención de los metales sobre estos materiales las interacciones de tipo electrostático juegan un papel clave, deben existir otro tipo de interacciones^{635, 636} que expliquen las diferencias que encontramos experimentalmente. De hecho, si se expresa la capacidad de estos polímeros en $\mu\text{mol/g}$ (**tabla 6.15.**) observamos que en el caso del Cr^{3+} y los polímeros **pATA**, **pAIDA** y **pDIDA** esta capacidad supera a las densidad de grupos ácido lo que corrobora la existencia de otros mecanismos adicionales en el proceso de adsorción.

polímero	Cr $\mu\text{mol/g}$	Pb $\mu\text{mol/g}$	Cd $\mu\text{mol/g}$
pA	18.3	10.7	5.7
pAGABA	199.6	82.5	38.8
pAGly	178.2	85.0	46.8
pATA	412.2	197.7	111.5
pDTA	313.9	174.4	91.3
pAIDA	558.5	213.6	176.9
pDIDA	521.3	213.6	184.5

Tabla 6.15. Capacidades de adsorción de Cr^{3+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} expresadas en $\mu\text{mol/g}$.

6.2.3. Estudios de adsorción y desorción de metales en columna.

Para estudiar la posible reutilización de estos materiales se llevaron a cabo estudios de adsorción en columna. Se realizó un ensayo preliminar para poner a punto las condiciones de adsorción y desorción y evaluar la capacidad de regeneración del polímero. Se empaclaron 200 mg del polímero **pDIDA** en una jeringa de 2.5 mL y se hizo recircular una disolución de Cr^{3+} de 50 ppm a pH 6 con la ayuda de una bomba peristáltica tomando una alícuota en cada una de las pasadas. Posteriormente, la columna se lavó utilizando disoluciones de HCl, HNO_3 o EDTA a diferentes concentraciones. Los resultados indican:

- ✓ Es necesaria una sola pasada a través de la columna para que esta retenga todo el metal que es capaz de adsorber.
- ✓ Mediante el empleo de EDTA no es posible desorber el metal que ha quedado retenido en la columna, independientemente de la concentración de EDTA utilizada.
- ✓ Cuando se utilizan disoluciones ácidas muy diluidas (HCl o HNO₃ al 1%) el lavado no es tan efectivo como cuando se utilizan disoluciones más concentradas (HCl al 5% o HNO₃ al 3%).

Los estudios de absorción y desorción en columna para el Cr³⁺ y para el Cd²⁺ se llevaron a cabo en las mismas condiciones exceptuando el polímero empleado (**pAIDA** para el Cr³⁺ y **pDIDA** para el Cd²⁺). En ambos casos se pesaron 200 mg de polímero y se empacaron en una jeringa de 2.5 mL. A través de esta columna se pasaron 150 mL de una disolución de metal de 50 ppm a pH 6 y se lavó con HCl al 5%. Para activar de nuevo los grupos carboxilo de la columna lo que se hizo lavar la columna con agua, después con el tampón que se utiliza en la síntesis, es decir, tampón carbonato 0.5M pH 12 y de nuevo con agua. Se le volvieron a pasar 150 mL de la misma disolución de metal y en esta ocasión el lavado se llevó a cabo con HNO₃ al 3%. Por último, y con el fin de ver la influencia de este segundo lavado, se volvieron a pasar otros 150 mL de metal. Los resultados obtenidos para ambos metales se recogen en la **tabla 6.16**.

	Cromo 1ª pasada	Cromo 2ª pasada	Cromo 3ª pasada	Cadmio 1ª pasada	Cadmio 2ª pasada	Cadmio 3ª pasada
mg/g de polímero	27.09	20.32	22.83	30.86	24.75	26.10
% de retención	73	55	65	85	69	71

Tabla 6.16. Resultados de los estudios de adsorción y desorción en columna para el Cr²⁺ (**pAIDA**) y el Cd²⁺ (**pDIDA**).

Los resultados que aparecen en esta tabla muestran que de los dos ácidos utilizados para desorber el metal retenido, el que proporciona mejores resultados es el HNO₃. Cuando se lava con HCl el polímero pierde capacidad de adsorción; sin embargo, cuando en el siguiente ensayo se lleva a cabo el lavado con HNO₃ no sólo no pierde capacidad sino que recupera algo de lo que perdió tras el lavado con HCl.

Capítulo 6

Para el Cr^{3+} la capacidad del polímero apenas varía con respecto a los resultados obtenidos en solución, sin embargo en el caso del Cd^{2+} la capacidad del polímero utilizado aumenta considerablemente cuando se trabaja en columna.

En el caso del Pb, en un primer ensayo, se trabajó en unas condiciones (200 mg de polímero **pDIDA** y 220 mL de una disolución de Pb^{2+} de 50 ppm pH5) en las cuales no conseguimos saturar la columna, la retención era siempre del 100%. Cuando se utilizaba HNO_3 al 3% para lavar la columna en los primeros 5 mL se eluía la mayor parte del Pb^{2+} . Sin embargo, al utilizar HCl al 5% era necesario un mayor volumen (15 mL) de disolución para eliminar el Pb^{2+} retenido. A raíz de estos resultados se modificaron las condiciones para trabajar próximos a la saturación de la columna y los lavados se llevaron a cabo siempre con HNO_3 al 3%. En concreto, se trabajó con 150 mg del polímero **pDIDA**, con 190 mL de una disolución de Pb^{2+} de 50 ppm a pH 5 y la columna se reutilizó hasta seis veces. Los resultados obtenidos se recogen en la **tabla 6.17**.

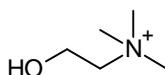
	Plomo 1ª pasada	Plomo 2ª pasada	Plomo 3ª pasada	Plomo 4ª pasada	Plomo 5ª pasada	Plomo 6ª pasada
mg/g de polímero	60.71	55.53	60.39	63	62.4	65.54
% de retención	100	93	99.5	100	97	98

Tabla 6.17. Resultados de los estudios de adsorción y desorción en columna para el Pb^{2+} (**pDIDA**).

Las ligeras fluctuaciones que se observan tanto en el porcentaje de la retención como en los mg de Pb^{2+} retenidos por gramo de polímero pueden ser debidos a errores experimentales. Los resultados demuestran la excelente capacidad de regeneración del material, que puede ser reutilizado un mínimo de seis veces sin pérdida de su capacidad de adsorción. Otra gran ventaja que presentan estos materiales es que para eliminar el metal retenido no se necesitan grandes volúmenes de ácido ya que, aunque en todos los casos se lavó con 20 mL de HNO_3 al 3%, la mayor parte del Pb^{2+} se encontraba en los primeros 5 mL de lavado. Este hecho también se observa en el caso del Cr^{3+} y del Cd^{2+} .

6.2.4. Síntesis de polímeros catiónicos de almidón y dextrina. Estudios de adsorción de colorantes aniónicos.

A raíz de los buenos resultados obtenidos en el apartado anterior con los polímeros de almidón aniónicos se pensó en la posibilidad de introducir otro tipo de funcionalización y generalizar la metodología. Como se mencionó en la introducción, el grupo de Crini^{627,628} ha puesto de manifiesto que la presencia de aminas terciarias en polímeros de almidón favorece la eliminación de ciertos colorantes con grupos aniónicos en su estructura. Teniendo en mente estos trabajos se eligió la colina como reactivo para introducir en el almidón una funcionalización similar.



colina

Figura 6.23. Estructura de la colina.

Mediante el empleo de este compuesto, en lugar de introducir aminas terciarias, se incorporan a las estructura del polímero sales de amonio cuaternarias que deben proporcionar resultados similares a los observados por Crini y col. Utilizando la misma metodología que la empleada para los polímeros aniónicos se prepararon dos nuevos polímeros, uno de almidón y otro de dextrina.

polímero	polisacárido
pACOL	almidón
pDCOL	dextrina

Tabla 6.18. Polímeros conteniendo colina sintetizados.

Para poner de manifiesto la capacidad de estos nuevos materiales en la eliminación de colorantes con grupos aniónicos se eligió el compuesto modelo que aparece en la **figura 6.24.**, que fue sintetizado en nuestro grupo y que ha sido utilizado para el etiquetado de ferritina⁶⁵².

652. Fernandez, B.; Galvez, N.; Sanchez, P.; Morales, J.; Santoyo, F.; Cuesta, R.; Dominguez-Vera, J. M., Red and blue ferritin nanomagnets by dye-labeling to the protein shell. *Inorganica Chimica Acta* **2007**, 360, (13), 3951-3954.

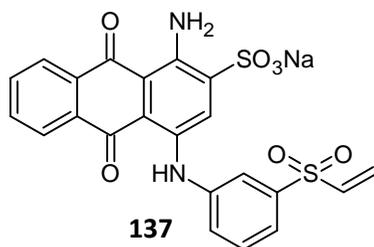


Figura 6.24. Estructura del colorante seleccionado.

En los ensayos de adsorción no sólo se utilizaron los nuevos polímeros sintetizados sino que además, se incluyeron todos los polímeros neutros preparados en la primera sección de este capítulo, es decir **pA**, **pβCD**, **pαCD**, **pAβCD** y **pAαCD** al objeto de comprobar la influencia de la nueva funcionalización incorporada a los polímeros. Así, se pesaron 100 mg de cada uno de los polímeros y se le adicionaron 10 mL de una disolución acuosa del colorante **137** a diferentes concentraciones. Tras 3 horas bajo agitación orbital a 180 rpm el sobrenadante se filtró y la concentración de colorante se determinó mediante absorción UV-Vis. Los resultados obtenidos para los diferentes polímeros a las concentraciones ensayadas se recogen en las **tablas 6.19. y 6.20.**

C₀ colorante ppm	pA	pACOL	pDCOL
20	1.92	2.21	2.21
50	3.54	5.20	5.20
100	5.19	10.04	9.85
250	7.15	14.13	12.54
500	8.24	24.79	13.89

Tabla 6.19. Capacidades de adsorción (en mg de colorante/g de polímero) del colorante **137** en agua a distintas concentraciones iniciales de colorante (3 horas de agitación a 22°C).

C_0 colorante ppm	p β CD	p α CD	pA β CD	pA α CD
20	0.68	1.15	1.29	1.50
50	0.88	1.56	2.08	2.51
100	1.11	1.81	2.75	3.54
250	1.43	2.65	3.58	4.51
500	1.64	3.30	3.95	5.16

Tabla 6.20. Capacidades de adsorción (en mg de colorante/g de polímero) del colorante **137** en agua para los polímeros de ciclodextrinas a distintas concentraciones iniciales de colorante (3 horas de agitación a 22°C).

Como puede observarse en estas tablas las capacidades de adsorción de los polímeros de CD se encuentran por debajo de las que presentan los polímeros de almidón. Entre los polímeros de CD los mejores resultados se obtienen con los mixtos, siendo la capacidad de adsorción mayor para el que contiene α -CD con respecto al que se obtiene a partir de β -CD. Sin embargo, los resultados más interesantes son los que nos proporcionan los nuevos polímeros sintetizados. Los dos polímeros, tanto el de almidón como el dextrina, sintetizados en presencia de colina presentan mejores propiedades de adsorción que su homólogo sin funcionalizar lo cual está de acuerdo con lo que ya habían observado Crini y col.^{627, 628} A bajas concentraciones (20 y 50 ppm) las diferencias con respecto al polímero **pA** no son tan significativas porque, en las condiciones en las que se ha trabajado, los polímeros **pACOL** y **pDCOL** retienen el 100% del colorante presente en solución, lo cual induce a pensar que no se han llegado a saturar.

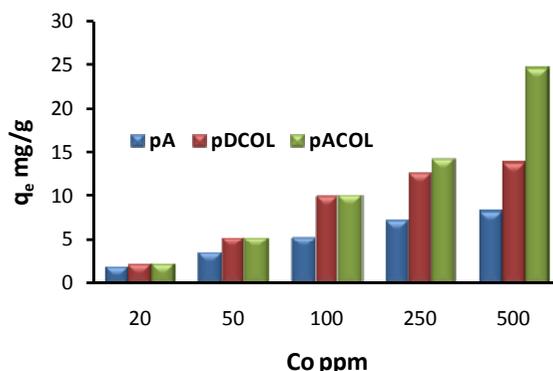


Figura 6.25. Comparación de las capacidades de adsorción (en mg de colorante/g de polímero) del colorante **137**, para los polímeros **pA**, **pACOL** y **pDCOL**, a distintas concentraciones iniciales.



Figura 6.26. Imagen de la disolución de colorante a 100 ppm sin tratar y tras haber sido tratada con los polímeros **pA** y **pACOL**.

A diferencia de lo que ocurre con los polímeros aniónicos en este caso el polisacárido que se utiliza en la síntesis si parece influir en la capacidad del material obtenido, aunque para poder afirmar este hecho serían necesarios más ensayos.

6.3. Conclusiones.

Se ha aplicado, de forma eficiente, el entrecruzamiento de polisacáridos con DVS a almidón y a ciclodextrinas (α y β) y se ha utilizado esta misma metodología para la obtención de polímeros mixtos almidón-CD. Se ha estudiado la capacidad de adsorción de los polímeros preparados frente a diferentes compuestos modelo.

En general, independientemente del polímero empleado las capacidades de adsorción de los mismos siguen el orden: fenol < 4-nitrofenol < β -naftol < bisfenol A. Otro hecho que se repite en todos los casos es que el polímero de almidón es el que presenta peores propiedades, lo cual resalta la implicación de la cavidad de la CD en los procesos de adsorción. Con respecto a los polímeros que contienen CDs se observa que para los contaminantes de pequeño tamaño, es decir, el fenol y el 4-nitrofenol, los polímeros puros presentan mayores capacidades que los mixtos y dentro de cada grupo los polímeros que contienen α -CD retienen más cantidad de soluto que los que se obtienen a partir de β -CD. Cuando se trabaja con β -naftol se mantiene la misma tendencia entre polímeros puros y mixtos; sin embargo no se encuentran diferencias entre la α -CD y la β -CD. En el caso del bisfenol A los mejores resultados se obtienen con los polímeros que contienen β -CD, independientemente de que este sea puro o mixto.

Además se ha ensayado la capacidad de estos mismos polímeros para la adsorción del fármaco modelo progesterona. En este caso los polímeros que presentan mejores propiedades son los que contienen β -CD y para el resto, tanto para el almidón como para los dos que contienen α -CD, las capacidades de adsorción son muy parecidas.

En todos los casos (compuestos fenólicos y progesterona) los resultados experimentales se ajustan bastante bien a la isoterma de Freundlich, observándose un aumento en la constante de Freundlich K_F al aumentar la capacidad de adsorción del material.

Se ha desarrollado una metodología sencilla que permite llevar a cabo, de forma simultánea, el entrecruzamiento y la introducción de grupos carboxilo sobre almidón o dextrina a través del empleo de DVS y ácidos carboxílicos sencillos conteniendo un grupo nucleófilo.

Capítulo 6

Se ha estudiado la capacidad de los nuevos materiales sintetizados para eliminar metales pesados de disoluciones acuosas y a raíz de estos estudios podemos afirmar que:

- ✓ A medida que aumenta el pH de la disolución aumenta la capacidad de adsorción de los diferentes polímeros, lo cual indica que la interacción tienen una importante componente electrostática. En las condiciones en las que se ha trabajado (50 ppm) el pH óptimo para Cr^{3+} y Cd^{2+} es de 6 y para Pb^{2+} de 5, ya que por encima de estos valores los metales precipitan.
- ✓ En todos los casos el equilibrio se alcanza en cortos periodos de tiempo.
- ✓ El polisacárido utilizado, almidón o dextrina, no repercute sobre la capacidad de los diferentes materiales obtenidos. En cambio el ácido carboxílico ejerce una profunda influencia. Así, las capacidades de adsorción de los materiales sintetizados siguen el siguiente orden iminodiacético > ácido tioacético > glicina ~ GABA.
- ✓ El metal que ha quedado retenido puede desorberse y el material regenerarse mediante el empleo de un pequeño volumen de HNO_3 al 3% lo que permite su reutilización sin apenas modificación de su capacidad. Esta característica hace que tengan un gran potencial como sistemas de extracción en fase sólida para la pre-concentración de metales.
- ✓ Los polímeros presentan una gran estabilidad química ya que son capaces de resistir medios fuertemente ácidos y básicos.

Esta misma metodología se ha aplicado con éxito a la obtención de polímeros catiónicos a través de la incorporación de sales de amonio cuaternarias. Se ha puesto de manifiesto las mejoras que se consiguen mediante esta funcionalización en la eliminación de colorantes de naturaleza aniónica.

6.4. Sección experimental.

Síntesis del polímero pA.

Una suspensión de 3 g de almidón en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 se calentó a reflujo hasta conseguir la completa solubilización del almidón (15-20 minutos). Una vez disuelto se dejó que alcanzase la temperatura ambiente y se le adicionaron 2 mL de DVS. La disolución resultante se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 7-8 horas. El polímero se filtró a vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y a continuación con MeOH y con éter. Por último se secó en la estufa de vacío a 50°C durante al menos una noche.

Procedimiento general para la síntesis de los polímeros p β CD y p α CD.

3 g de ciclodextrina (α -CD o β -CD) se disolvieron en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 y la disolución resultante se mantuvo bajo agitación durante 30 minutos. A continuación se adicionaron 2 mL de DVS y tras 7-8 horas de reacción el polímero que se formó se filtró a vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y a continuación con MeOH y con éter. Por último se secó en la estufa de vacío a 50°C durante al menos una noche.

Procedimiento general para la síntesis de los polímeros mixtos pA β CD y pA α CD.

Una suspensión de 1.5 g de almidón en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 se calentó a reflujo hasta conseguir la completa solubilización del almidón (15-20 minutos). Una vez disuelto se dejó que alcanzase la temperatura ambiente y se le adicionaron 1.5 g de CD (α o β). Transcurridos 30 minutos se le adicionaron 2 mL de DVS. La disolución resultante se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 7-8 horas. El polímero se filtró a vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y a continuación con MeOH y con éter. Por último se secó en la estufa vacío a 50°C durante al menos una noche.

	almidón gramos	β -CD gramos	α -CD gramos	DVS gramos	gramos polímero
pA	3	-	-	2	4.1
p β CD	-	3	-	2	3.8
p α CD	-	-	3	2	3.6
pA β CD	1.5	1.5	-	2	3.9
pA α CD	1.5	-	1.5	2	3.8

Tabla 6.21. Cantidades de polisacárido y DVS utilizadas en la preparación de los distintos polímeros y cantidad de polímero obtenida.

Procedimiento general para la síntesis de los polímeros pAGABA, pAGly, pATA, pAIDA.

Una suspensión de 3 g de almidón en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 se calentó a reflujo hasta conseguir la completa solubilización del almidón (15-20 minutos). Una vez disuelto se dejó que alcanzase la temperatura ambiente y se le adicionaron 2 mL de DVS. La disolución resultante se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente y a partir de los 10-15 minutos empezó a precipitar el polímero. Tras 30 minutos, desde la adición de la DVS, se le adicionó el ácido carboxílico correspondiente. Transcurridas 7-8 horas (al igual que antes, desde la adición de la DVS) el polímero se filtró a vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y a continuación con MeOH y con éter. Por último se secó en la estufa de vacío a 50°C durante al menos una noche.

En todos los casos se utilizó el ácido correspondiente, excepto en el caso del ácido tioacético que se empleó la sal sódica del mismo.

POLÍMERO	gramos almidón	mL DVS	ácido utilizado	gramos ácido	gramos polímero
pAGABA	3	2	GABA	1.9	3.93
pAGly	3	2	glicina	1.4	3.87
pATA	3	2	tioacético	2.1	3.91
pAIDA	3	2	iminodiacético	2.5	3.89

Tabla 6.22. Reactivos y cantidades empleadas en la síntesis de polímeros de almidón aniónicos y cantidad de polímero obtenida.

Procedimiento general para la síntesis de los polímeros pDTA y pDIDA.

Una disolución de 3 g de dextrina en 150 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 (para conseguir que se disuelva la dextrina hay que adicionarla poco a poco sobre el tampón y siempre con agitación) se mantuvo bajo agitación a t.a. durante 30 minutos y a continuación se le adicionaron 2 mL de DVS. La disolución resultante se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente y a partir de los 10-15 minutos empezó a precipitar el polímero. Tras 30 minutos, desde la adición de la DVS, se le adicionó el ácido carboxílico correspondiente. Transcurridas 7-8 horas (al igual que antes, desde la adición de la DVS) el polímero se filtró a vacío, se lavó con agua hasta pH neutro y a continuación con MeOH y con éter. Por último se secó en la estufa de vacío a 50°C durante al menos una noche.

POLÍMERO	gramos dextrina	mL DVS	ácido utilizado	gramos ácido	gramos polímero
pDTA	3	2	tioacético	2.1	3.60
pDIDA	3	2	iminodiacético	2.5	3.32

Tabla 6.23. Reactivos y cantidades empleadas en la síntesis de polímeros de dextrina aniónicos y cantidad de polímero obtenida.

Procedimiento general para la síntesis de los polímeros pACOL y pDCOL.

Para la síntesis de estos polímeros se utilizó la misma metodología que la utilizada para los polímeros aniónicos de almidón y dextrina, pero en lugar de adicionar el ácido correspondiente se utilizó colina. Las cantidades con las que se trabaja y la cantidad de polímero obtenida se recogen en la **tabla 6.24**.

POLÍMERO	POLISACÁRIDO	gramos polisacárido	mL DVS	gramos colina	gramos polímero
pACOL	almidón	3	2	2.6	3.91
pDCOL	dextrina	3	2	2.6	3.61

Tabla 6.24. Reactivos y cantidades empleadas en la síntesis de polímeros contenido aminas cuaternarias y cantidad de polímero obtenida.

Estudios de adsorción de compuestos fenólicos y progesterona.

A 100 mg de polímero (pA, pβCD, pαCD, pAβCD y pAαCD) se le adicionaron 10 mL de la disolución de soluto y la suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital a 180 rpm durante 2-3 horas y a temperatura ambiente (22°C). A

continuación, tanto la disolución tratada con el polímero como la disolución de partida se filtraron utilizando un filtro de jeringa de celulosa regenerada (con un tamaño de poro de 0.2µm) y la concentración se midió mediante absorción UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro de absorción Spectronic Unicam Helios α. En los casos en los que la concentración no cae dentro del rango lineal de la recta de calibrado se llevaron a cabo diluciones seriadas para poder medir la concentración.

Soluto	Disolvente utilizado	C ₀ iniciales empleadas (ppm)	λ nm
fenol	agua	20, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000	270
4-nitrofenol	agua	20, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000	317
β-naftol	agua-MeOH(10%) y agua-DMSO(10%)	20, 50, 100, 250, 500, 1000	328
bisfenol A	agua-MeOH(10%) y agua-DMSO(10%)	20, 50, 100, 250, 500, 1000	278
progesterona	agua-MeOH(10%)	5, 10, 20, 30, 40, 50	249

Tabla 6.25. Condiciones empleadas en los estudios de adsorción.

Estudio de la influencia del pH en la adsorción de metales pesados.

Para estudiar la influencia del pH sobre la capacidad de estos polímeros aniónicos para retener metales pesados se preparó una disolución de 50 ppm de cada uno de los metales a estudiar (Cr³⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺) a partir de una disolución patrón de 1000 ppm al 1% de HNO₃. En todos los casos esta disolución inicial tenía un pH en torno a 2 que se modificó mediante la adición de una disolución de NaOH al 10%. En el caso del Cr³⁺ y del Cd²⁺ se prepararon disoluciones a pH 3, 4, 5 y 6 ya que a partir un pH cercano a 7 el metal comenzó a precipitar. En el caso del Pb²⁺ sólo fue posible llegar a pH 5 ya que la precipitación de este metal comienza antes. A 50 mg de polímero (**pAGABA** para Cr³⁺ y Pb²⁺ y **pAGly** para el Cd²⁺) se le adicionaron 20 mL de cada una de las disoluciones anteriores. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital a 180 rpm durante 1 noche. La disolución se centrifuga y se toman 3 mL del sobrenadante. La concentración de metal en solución, tanto de las muestras de partida como las tratadas con el polímero se determinó mediante absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100.

Estudio de la influencia del tiempo en la adsorción de metales pesados.

Para estudiar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio se preparó una disolución de 50 ppm de cada uno de los metales a estudiar (Cr^{3+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}) a partir de una disolución patrón de 1000 ppm al 1% de HNO_3 y se ajustó al pH óptimo de trabajo, pH 6 para Cr^{3+} y Cd^{2+} y pH 5 para Pb^{2+} . Se pesaron 75 mg de cada uno de los polímeros con los que se trabajó y se les adicionaron 40 mL de la disolución de metal. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital a 180 rpm y cada cierto tiempo (5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 1020 minutos) se tomó una alícuota (1.5-2 mL) para medir su concentración. En el caso del Cr^{3+} y el Pb^{2+} se trabajó con los polímeros **pAGABA**, **pAGly** y **pATA** y en el caso del Cd^{2+} se utilizaron los polímeros **pAGly**, **pATA** y **pAIDA**. Al igual que en el estudio en función del pH la concentración de metal en solución se determinó mediante absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100.

Estudio de la capacidad de adsorción de metales pesados.

A 50 mg de cada uno de los polímeros (**pA**, **pAGABA**, **pAGly**, **pATA**, **pDTA**, **pAIDA** y **pDIDA**) se le adicionaron 40 mL de una disolución de metal de 50 ppm a pH 6 para Cr^{3+} y Cd^{2+} y pH 5 para Pb^{2+} . La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital a 180 rpm durante una noche a temperatura ambiente (22°C). Las muestras se centrifugaron y se tomaron 3 mL del sobrenadante. La concentración de metal inicial y la que queda en solución se determinaron mediante absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100.

Estudios de adsorción y desorción en columna.

Cromo

200 mg del polímero **pAIDA** se suspendieron en agua y se empacaron, con la ayuda de una bomba peristáltica, en una jeringa de 2.5 mL provista de un filtro. Una vez montada la columna se pasaron 50 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 para activar los grupos carboxilo, y después 50 mL de agua. Una vez montada y activada la columna se pasaron 150 mL de una disolución de Cr^{3+} de 50 ppm a pH 6 a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. A continuación la columna se lavó con 20

Capítulo 6

mL de HCl al 5% para desorber el metal retenido, recogiendo esta disolución de lavado en alícuotas de 5 mL. A continuación, y con el fin de reactivar de nuevo la columna, se lavó con 45 mL de agua, 45 mL de tampón carbonato 0.5M pH 12 y por último con otros 45 mL de agua. De nuevo se pasaron 150 mL de una disolución de Cr^{3+} de 50 ppm a pH 6 a la misma velocidad de flujo, es decir, 1.5 mL/min. La columna se volvió a lavar y a regenerar exactamente igual que la vez anterior pero en lugar de llevar a cabo el lavado con HCl al 5% se utilizó una disolución de HNO_3 al 3%. Por último, se volvió a circular a través de la columna una disolución (150 mL) de Cr^{3+} a pH 6. La concentración de Cr^{3+} en cada una de las disoluciones, incluyendo las disoluciones de partida, se determinó mediante absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 100.

Cadmio.

El estudio se llevó a cabo exactamente igual que en el caso del Cr^{3+} pero, en lugar de utilizar el polímero **pAIDA**, se utilizó el polímero **pDIDA**.

Plomo.

Para el caso del Pb se siguió el mismo procedimiento utilizado en el caso del Cr^{3+} y del Cd^{2+} con algunas diferencias que se enumeran a continuación:

- ✓ Se utilizaron 150 mg del polímero **pDIDA**.
- ✓ A través de la columna se pasaron 190 mL de una disolución de Pb de 50 ppm a pH 5.
- ✓ En este caso todos los lavados se llevaron a cabo con HNO_3 al 3%.
- ✓ La columna se reutilizó un total de 6 veces.

Determinación de los grupos ácido superficiales⁶⁵³.

A 1.5 g de polímero se le adicionaron 80 mL de HCl al 5%. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 1 noche. El polímero se filtró y se lavó con agua hasta pH neutro, y después con MeOH y con éter. Se secó en la estufa de a 50°C durante al menos una noche.

653.Boehm, H. P., Chemical identification of surface groups. 1966, 16, 179-274.

Se pesan unos 400 mg del polímero tratado con HCl y se le adicionaron 40 mL de una disolución de NaHCO_3 0.02N. La suspensión resultante se mantiene bajo agitación orbital a 180 rpm durante 48 horas. Trascorrido ese tiempo las muestras se centrifugaron y se tomaron varias alícuotas del sobrenadante que se valoraron con una disolución de HCl 0.02N. También se valoró la disolución de NaHCO_3 de partida, y por diferencia se estableció la cantidad de grupos ácido que contiene cada polímero. Para establecer el punto de equivalencia se utilizó un pHmetro.

Estudios de adsorción del colorante 137

A 100 mg de polímero (**pA, p β CD, p α CD, pA β CD, pA α CD, pACOL y pDCOL**) se le adicionaron 10 mL de la disolución de soluto y la suspensión resultante se mantuvo bajo agitación orbital a 180 rpm durante 2-3 horas y a temperatura ambiente (22°C). A continuación, tanto la disolución tratada con el polímero como la disolución de partida se filtraron utilizando un filtro de jeringa de celulosa regenerada (con un tamaño de poro de 0.2 μm) y la concentración se midió mediante absorción UV-Vis, utilizando un espectrofotómetro de absorción Spectronic Unicam Helios α . En los casos en los que la concentración no cae dentro del rango lineal de la recta de calibrado se llevaron a cabo diluciones seriadas para poder medir la concentración

Soluto	Disolvente utilizado	C₀ iniciales empleadas (ppm)	λ nm
137	agua	20, 50, 100, 250, 500	595

Tabla 6.26. Condiciones empleadas en los estudios de adsorción.

