



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 189 602**

② Número de solicitud: 200002457

⑤ Int. Cl.7: **B01D 15/08**
C12N 11/08

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.10.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2003**

Fecha de la concesión: **07.07.2004**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.2004**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.08.2004

⑰ Titular/es: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, Edf. de la Convalecencia
30003 Murcia, ES

⑱ Inventor/es: **García Ruiz, Pedro Antonio**

⑳ Agente: **Fernández Prieto, Ángel**

㉔ Título: **Procedimiento para la inmovilización de un ligando sobre un soporte.**

㉖ Resumen:

Procedimiento para la inmovilización de un ligando sobre un soporte.

El procedimiento, en el que (i) al menos uno de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático, y (ii) el otro de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un doble enlace, comprende irradiar con luz visible o ultravioleta una mezcla formada por dichos ligando y soporte para generar un anillo de ciclobutano, a partir de los dobles enlaces presentes en dichos ligando y soporte, mediante una reacción de cicloadición fotoquímica 2 + 2, con lo que dicho ligando queda inmovilizado sobre dicho soporte. De utilidad para inmovilizar sustratos, reactivos, catalizadores, enzimas aditivos, fármacos o microorganismos en sustratos poliméricos.

ES 2 189 602 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para la inmovilización de un ligando sobre un soporte.

5 Campo de la invención

La invención se refiere, en general, a la inmovilización de ligandos de interés sobre soportes.

10 Antecedentes de la invención

10

Debido a las numerosas ventajas que puede aportar, la inmovilización de productos de interés (por ejemplo, sustratos, reactivos, catalizadores, aditivos, fármacos, enzimas o bacterias) sobre soportes (por ejemplo, oligómeros y polímeros) está siendo cada vez más ampliamente utilizada con diferentes fines: insolubilización, catálisis heterogénea, liberación controlada de productos o fármacos, reactivos insolubili-

15

zados, reacciones soportadas sobre polímeros o superficies con propiedades específicas, etc.

Las técnicas generales para la inmovilización en soportes de productos de interés se dividen, en general, en tres tipos fundamentales: adsorción física, atrapamiento o enlace covalente.

20

La generación de los soportes, o el proceso de formación del enlace covalente, en los métodos actualmente empleados se basan en reacciones químicas entre grupos funcionales y, a menudo, son necesarias varias etapas y reacciones consecutivas [por ejemplo, reacción de un grupo amino con un aldehído para formar una imina y reducción posterior de la imina a amina] , muchas veces en condiciones de reacción muy enérgicas, que no soportan, sin alterar sus propiedades, los ligandos a inmovilizar.

25

La presente invención utiliza unos soportes y/o ligandos funcionalizados que contienen grupos carbonilo alfa-beta insaturados conjugados con anillos aromáticos, por ejemplo, derivados, generalmente ésteres, del ácido cinámico [ácido 3-fenil-propenoico], o de un análogo del mismo, de los soportes y/o de los ligandos para inmovilizar dichos ligandos sobre dichos soportes mediante una reacción de cicloadición fotoquímica concertada entre los grupos funcionales reactivos presentes en los soportes y en los ligandos a inmovilizar.

30

Se han descrito con anterioridad diferentes aplicaciones de los ésteres del ácido cinámico, y análogos del mismo, que pueden dar reacciones de entrecruzamiento mediante una reacción fotoquímica concertada que ha sido utilizada ampliamente en fotorresinas entrecruzables para aplicaciones fotográficas, en escultura dental, etc. También se han utilizado dichos ésteres del ácido cinámico, y sus análogos, como protectores solares en cremas. En la BIBLIOGRAFÍA se recogen diversas referencias bibliográficas relacionadas derivados del ácido cinámico, y sus análogos, y sus aplicaciones. Sin embargo, en ninguna de dichas referencias bibliográficas se hace mención a ningún método de inmovilización de productos de interés sobre soportes que utilice ésteres del ácido cinámico, o sus análogos, como reactivos o soportes de inmovilización.

40

Compendio de la invención

45

La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar un procedimiento alternativo para la inmovilización de ligandos a soportes.

La solución aportada por la invención se basa en que los inventores han observado que la cicloadición fotoquímica concertada de soportes y ligandos que poseen grupos carbonilo alfa-beta insaturados conjugados con un anillo aromático permite generar enlaces covalentes en condiciones muy suaves, lo que facilita la inmovilización de ligandos sobre soportes, en particular, de ligandos que serían muy difíciles de inmovilizar sobre soportes poliméricos por otros procedimientos.

50

La invención se ilustra mediante la inmovilización de ligandos a soportes por enlaces covalentes (Ejemplos 1 a 3), la funcionalización de soportes para la inmovilización de ligandos por enlace covalente (Ejemplos 4 y 5), la inmovilización de enzimas (Ejemplo 6), y la eliminación de fenol de aguas residuales (Ejemplo 7) como ilustración de una de las posibles aplicaciones prácticas del procedimiento proporcionado por esta invención.

55

Un objeto de esta invención lo constituye un procedimiento para inmovilizar un ligando en un soporte mediante una reacción de cicloadición fotoquímica concertada entre el soporte y el ligando que genera un anillo de ciclobutano cuando se irradia con luz visible o ultravioleta una mezcla que contiene dichos

60

soporte y ligando.

Descripción detallada de la invención

5 La invención proporciona un procedimiento para la inmovilización de un ligando en un soporte, en el que (i) al menos uno de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, anillo aromático, y (ii) el otro de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un doble enlace, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta una mezcla formada por dichos ligando y soporte para generar un anillo de ciclobutano, a partir de los dobles enlaces presentes
10 en dichos ligando y soporte, mediante una reacción de cicloadición fotoquímica 2 + 2, con lo que dicho ligando queda inmovilizado sobre dicho soporte.

El ligando puede ser cualquier producto de interés, por ejemplo, un sustrato, un reactivo, un catalizador, un aditivo, un fármaco, una enzima, un microorganismo, etc., que posee, de forma natural o
15 artificial, al menos, un doble enlace. Preferentemente, dicho ligando posee, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático. En una realización particular dicho ligando está derivatizado en forma de un éster del ácido cinámico, o de un análogo del mismo.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análogo del ácido cinámico" se refiere a un
20 compuesto que contiene un grupo carbonilo alfa-beta insaturado, o gamma-delta, diinsaturado conjugado con un anillo aromático.

El soporte puede ser cualquiera de los soportes habitualmente utilizados en la inmovilización de productos, preferentemente, un oligómero o un polímero, con un peso molecular igual o superior a 500, que
25 posee, de forma natural o artificial, un grupo funcional apropiado que contiene, al menos, un doble enlace. Preferentemente, dicho soporte posee, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático. En una realización particular dicho soporte está derivatizado en forma de un éster del ácido cinámico, o de un análogo del mismo.

De acuerdo con el procedimiento de inmovilización de ligandos sobre soportes proporcionado por esta
30 invención, al menos uno de dichos ligando o soporte debe contener, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático, mientras que el otro de dichos ligando o soporte debe contener, al menos, un doble enlace. En una realización particular y preferida, ambos miembros, ligando y soporte, contienen, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos,
35 un anillo aromático.

Tanto el soporte como el ligando pueden estar en forma sólida o disueltos o suspendidos en unos disolventes apropiados.

40 Para la irradiación con luz visible o ultravioleta se debe controlar la intensidad y el tiempo de la irradiación. En general, intensidades de irradiación superiores a 5 lux son suficientes para provocar la transformación. No obstante, la cantidad de energía recibida (intensidad por tiempo) necesaria depende de la cantidad de materia a transformar. En este sentido debe tenerse presente que, en general, los rendimientos cuánticos suelen ser muy altos, normalmente del orden del 80%.

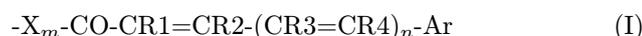
45 La reacción de cicloadición fotoquímica concertada 2+2 genera enlaces covalentes entre el soporte y el ligando en condiciones muy suaves, lo que permite su empleo en la obtención de soportes de inmovilización o en la inmovilización y anclaje de ligandos. Además, dicha reacción es muy versátil y resuelve diferentes inconvenientes de numerosos procesos industriales.

50 El procedimiento de inmovilización de ligandos sobre soportes proporcionado por esta invención permite inmovilizar prácticamente cualquier ligando de interés, bajo condiciones suaves, impidiendo de este modo que se alteren sus propiedades, y presenta numerosas aplicaciones en diversos sectores de la técnica, por ejemplo, en alimentación (para la creación de superficies antioxidantes o conservantes), en el tratamiento de aguas residuales (mediante la inmovilización de enzimas que eliminan determinados compuestos nocivos o tóxicos), en farmacia (para la elaboración de medicamentos con liberación controlada de fármacos), etc.

60 En una realización particular del procedimiento Proporcionado por esta invención, tanto el ligando como el soporte están derivatizados en forma de un éster del ácido cinámico, o de un análogo del mismo. En este caso particular, el procedimiento para la inmovilización de un ligando en un soporte proporcionado por esta invención comprende irradiar con luz visible o ultravioleta, una mezcla que contiene:

ES 2 189 602 B1

i) un soporte que comprende, unido a dicho soporte, al menos, un grupo de fórmula general (I)



5 donde

X es el resto de un grupo funcional presente en el soporte;

R1, R2, R3 y R4, independientemente entre sí, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂ ;

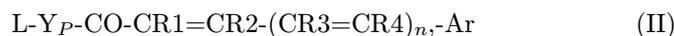
20 R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

m es 0 ó 1;

n es 0 ó 1; y

25

iii) un ligando de fórmula general (II)



30

donde

L es el resto de un ligando;

Y es el resto de un grupo funcional presente en el ligando;

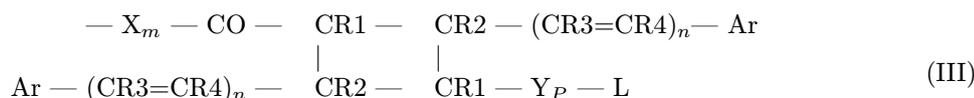
35

p es 0 ó 1; y

R1, R2, R3, R4, Ar y n son los definidos previamente;

para generar un anillo de ciclobutano, mediante una reacción de cicloadición fotoquímica 2+2, y obtener un ligando inmovilizado sobre dicho soporte de fórmula general (III)

40



45

donde

X, Y, L, R1, R2, R3, R4, Ar, m, n y p son los definidos previamente.

50

La proporción entre la cantidad de soporte y la cantidad de ligando presente en la mezcla puede ser cualquiera, si bien, en general, dichas proporciones serán del mismo orden. En una realización particular, el número de equivalentes (referidos a número de dobles enlaces reactivos por mol) de soporte es igual o superior al número de equivalentes de ligando.

55

El ligando puede ser cualquier producto de interés, por ejemplo, un sustrato, un reactivo, un catalizador, un aditivo, un fármaco, una enzima, un microorganismo, etc., que posee un grupo funcional que permite obtener el ligando de fórmula (II). El grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado a un anillo aromático presente en el ligando (II) puede estar presente en dicho ligando bien de forma natural, por ejemplo, en el caso del ácido cafeico, o bien artificial mediante derivatización del ligando con ácido cinámico (o un análogo del mismo) o con un derivado activado del mismo, por ejemplo, un haluro, preferentemente cloruro, del ácido cinámico (o un análogo del mismo) que puede reaccionar con, por ejemplo, un grupo hidroxilo presente en el ligando y obtener un ligando derivatizado de fórmula (II) en el que Y

60

es 0 y p es 1, es decir, un éster del ácido cinámico (o de un análogo del mismo) y el ligando.

En una realización particular, en el ligando (II), Y es 0, p es 1, Ar es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo o aldehído, n es 0 y R1 y R2 son hidrógeno.

5 El soporte puede ser cualquiera de los soportes habitualmente utilizados en la inmovilización de productos, preferentemente, un oligómero o un polímero, con un peso molecular igual o superior a 500, y debe poseer al menos un grupo funcional que permita obtener el soporte derivatizado de fórmula (I). El grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado a un anillo aromático presente en el soporte (I) puede estar presente en dicho soporte bien de forma natural o bien artificial mediante derivatización del soporte con ácido cinámico (o un análogo del mismo) o con un derivado activado del mismo, por ejemplo, un haluro, preferentemente cloruro, del ácido cinámico (o un análogo del mismo) que puede reaccionar con, por ejemplo, un grupo hidroxilo presente en el soporte y obtener un soporte derivatizado de fórmula (I) en el que X es 0 y m es 1, es decir, un éster del ácido cinámico (o de un análogo del mismo) y el soporte.

15 En una realización particular, en el soporte (I), X es 0, m es 1, Ar es fenilo, n es 0 y R1 y R2 son hidrógeno.

Tanto el soporte (I) como el ligando (II) pueden estar en forma sólida o líquida, disueltos o suspendidos en unos disolventes apropiados.

20 Para la irradiación con luz visible o ultravioleta se debe controlar la intensidad y el tiempo de la irradiación. En general, intensidades de irradiación superiores a 5 lux son suficientes para provocar la transformación. No obstante, tal como se ha mencionado previamente, la cantidad de energía recibida (intensidad por tiempo) necesaria depende de la cantidad de materia a transformar.

25 La reacción de cicloadición fotoquímica concertada 2+2 genera enlaces covalentes entre el soporte (I) y el ligando (II) en condiciones muy suaves, lo que permite su empleo en la obtención de soportes de inmovilización o en la inmovilización Y anclaje de ligandos. Además, dicha reacción es muy versátil y resuelve diferentes inconvenientes de muchos procesos industriales.

Aunque se ha descrito con anterioridad que los ésteres del ácido cinámico y sus análogos pueden dar reacciones de, entrecruzamiento mediante una reacción fotoquímica concertada, su potencialidad como medio para unir entre sí dos compuestos diferentes con el fin de obtener copolímeros o con el fin de injertar monómeros en un polímero existente previamente ha resultado sorprendente.

35 La invención también proporciona un procedimiento para la generación de un soporte adecuado para la inmovilización de ligandos por adsorción física y/o atrapamiento covalente, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta, a un soporte, en estado sólido, que comprende, unido a dicho soporte, al menos, un grupo de la fórmula general (I) antes mostrada.

El soporte así generado es susceptible de inmovilizar un ligando de la fórmula general (II) antes mostrada, por reacción entre dicho soporte y el ligando (II).

45 La invención también proporciona un procedimiento para la generación de un ligando adecuado para ser inmovilizado sobre un soporte por adsorción física y/o atrapamiento covalente, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta a un ligando de la fórmula general (II) antes mostrada, en estado sólido. El ligando así generado es susceptible de ser inmovilizado sobre un soporte de la fórmula general (I) antes mostrada, por reacción entre dicho soporte (I) y el ligando.

50 **Modos de realización de la invención y ejemplos de aplicaciones posibles**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos donde se muestran, sin pretender limitar el alcance de la invención, diferentes formas de utilizar el procedimiento de inmovilización basado en la reacción antes descrita. Se ordenan y clasifican los ejemplos atendiendo a algunas aplicaciones concretas desarrolladas y verificadas experimentalmente del procedimiento.

Para la realización de los ejemplos se prepararon previamente los monocinamatos de ácido ascórbico y pirogalol así como los derivados totalmente esterificados de los siguientes compuestos:

60 Ligandos: 4-hidroxi-benzaldehído y 1,2-diisopropilidén-Dglucofuranosa.

Monómeros de pequeño tamaño(especialmente monosacáridos): D - arabinosa, D - glucosa, D -

glucitol, D - manitol, D - arabinohexosulosa (D - glucosona), glicerina.

Oligómeros (tamaño intermedio): Lactosa, maltosa.

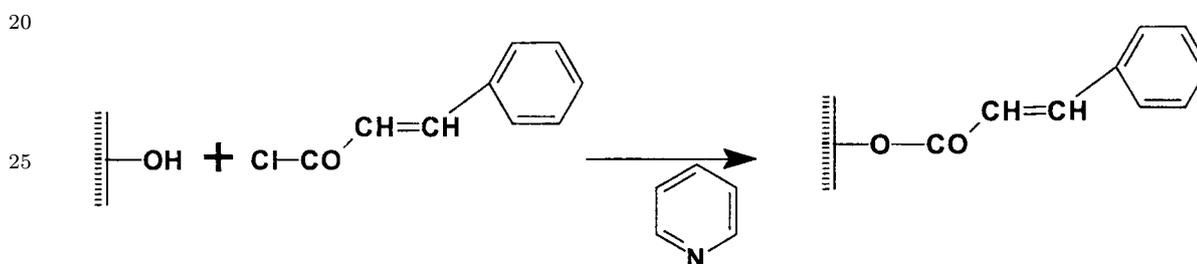
5 Polímeros: alcohol polivinílico, inulina, dextrina, dextranso. Para éstos se obtuvieron también con diferentes grados de esterificación (30 %, 40 %, 60 %, 80 %).

En todos los casos se utilizó piridina como disolvente y cloruro de cinamoilo como reactivo mediante el procedimiento descrito en la referencia bibliográfica [1].

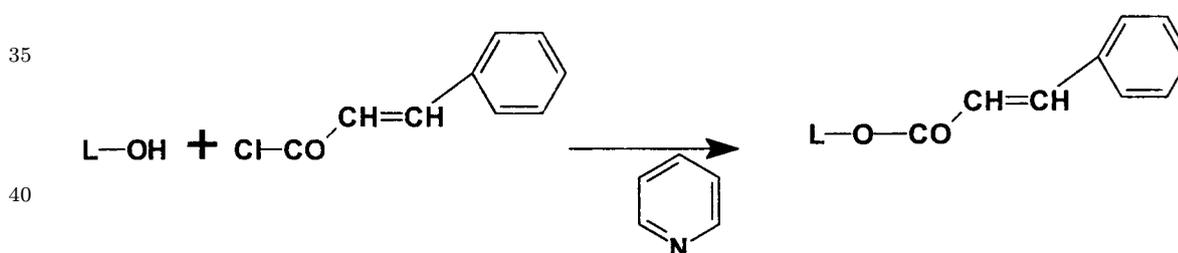
10 En el Esquema de Reacción 1 se ilustra un caso particular de dicha reacción previa de preparación del soporte o ligando, en donde el soporte y el ligando tienen grupos hidroxilo, el compuesto que contiene el grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con un anillo aromático es el cloruro de cinamoilo y el disolvente utilizado es piridina.

Esquema de Reacción 1

1.1 Preparación del soporte



1.2 Preparación del ligando



Las irradiaciones con luz ultravioleta (uv) se realizaron con una lámpara Osram Hol-125 desprovista de su envoltura exterior de cristal (para máxima intensidad en la región ultravioleta) a una distancia de 40 cm lo que equivalía a una intensidad de iluminación de 500 lux aproximadamente.

I. Inmovilización directa por enlace covalente

El procedimiento consiste en irradiar juntos el soporte y el ligando a inmovilizar, funcionalizados en forma de ésteres del ácido cinámico, o sus análogos.

Ejemplo 1

Inmovilización de pirogalol

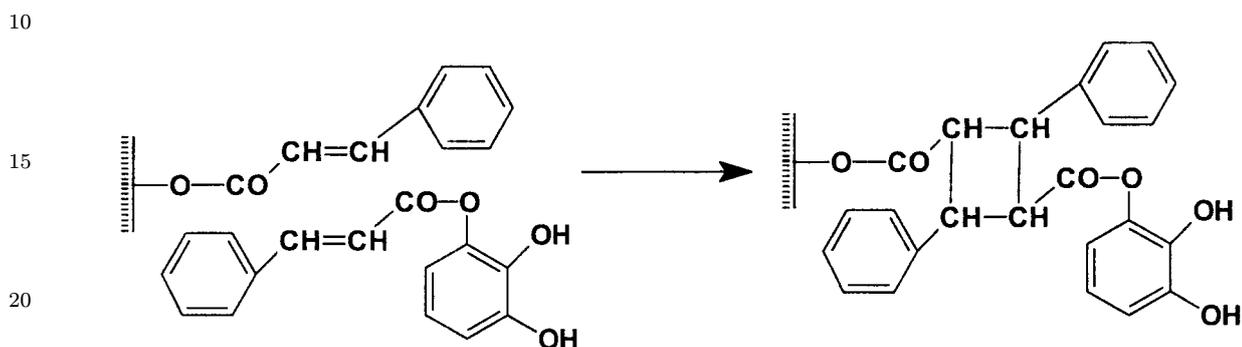
Se utilizaron como soportes poliméricos los derivados totalmente cinamoilados de alcohol polivinílico e inulina.

Para realizar la inmovilización se prepararon disoluciones (5 g/litro) en cloroformo de cada uno de los soportes y a diferentes fracciones de ellas se adicionó monocinamato de pirogalol para obtener relaciones

ligando/soporte de: 1/10, 1/20, 1/100 (en peso).

Muestras de esas disoluciones se extendieron sobre superficies de vidrio planas o sobre la superficie de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro, se dejó evaporar el disolvente y se sometieron a irradiación uv durante 15 minutos.

Esquema de Reacción 2



25 Transcurrida la reacción en estado sólido [véase el Esquema de Reacción 2], las bolas se lavaron con un disolvente, por ejemplo, cloroformo/hexano 1:3, para disolver el cinamato del ligando que no hubiera sufrido entrecruzamiento, y las muestras irradiadas en cristales se disolvieron en cloroformo, precipitando el polímero por adición de hexano hasta la mencionada relación.

El producto resultante tiene aplicación en la obtención de superficies con propiedades antioxidantes.

30 La capacidad antioxidante fue valorada cualitativa y cuantitativamente mediante diferentes métodos (nitrato de plata amoniacal) (Fehling) obteniendo rendimientos entre el 60% y el 80% del valor máximo esperado para la reacción total.

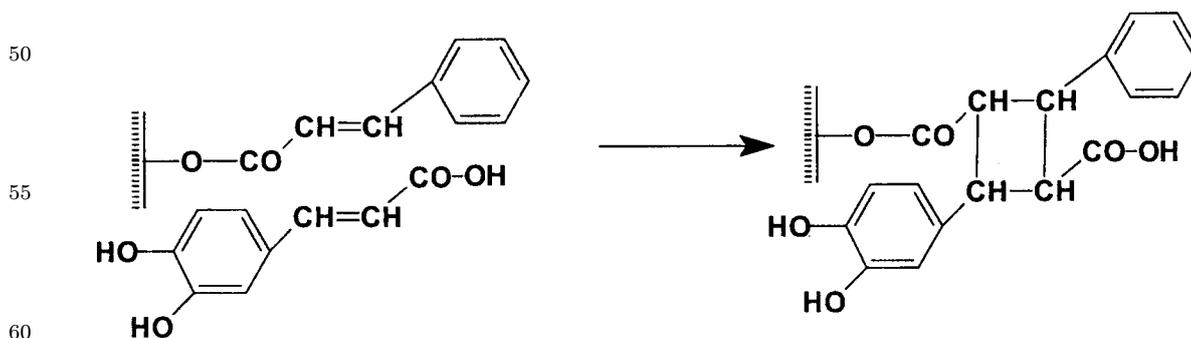
Ejemplo 2

35 *Inmovilización de ácido cafeico*

Se repitió el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 pero utilizando cinamato de inulina como soporte y ácido cafeico (directamente) como ligando, tal como se muestra en el Esquema de Reacción 3, en una relación ligando/soporte de 1/100.

El producto resultante tiene aplicación en la obtención de superficies con propiedades antioxidantes naturales. Los ensayos de reductores fueron positivos.

45 Esquema de Reacción 3



Ejemplo 3

Inmovilización de aditivos sobre acetato de polivinilo

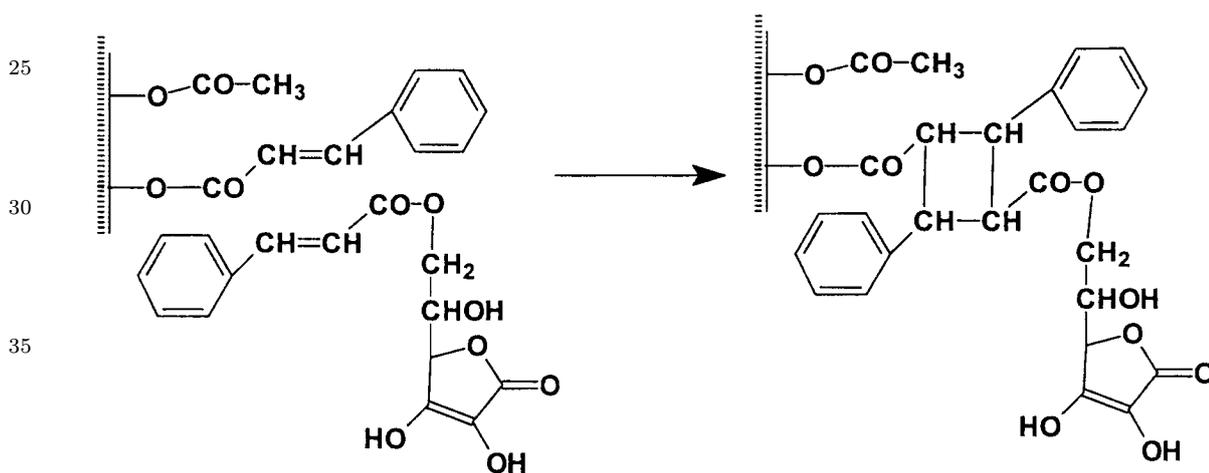
5 El acetato de polivinilo se usa ampliamente en tecnología de alimentos como recubrimiento. Este ejemplo ilustra una de las posibilidades de introducir sobre el acetato de polivinilo aditivos que permanezcan unidos a la envoltura o que puedan liberarse de forma controlada.

10 A partir de acetato de polivinilo de bajo peso molecular comercial se preparó un derivado cinamoilado al 10% por reacción con cloruro de cinamoilo en piridina, tal como se describe en la referencia bibliográfica [1].

15 Por otra parte, se preparó el aditivo a inmovilizar [un derivado monocinamoilado de ácido ascórbico (véase el Esquema de Reacción 4)].

20 Para la inmovilización del aditivo se procedió como en el Ejemplo 1 con una relación ligando/sopORTE de 1/100. Los productos obtenidos, que tienen aplicación en la conservación de alimentos, dieron positivos los controles de poder reductor.

Esquema de Reacción 4



II. Funcionalización (activación) de soportes para inmovilización por enlace covalente

45 La introducción de un número determinado de grupos funcionales en un soporte polimérico puede realizarse mediante el procedimiento de esta invención de forma muy segura pues basta con disolver conjuntamente las cantidades adecuadas del soporte funcionalizado en forma de un derivado de éster cinámico o un análogo del mismo y del compuesto que contenga el grupo funcional elegido, evaporar el disolvente y realizar la irradiación visible o ultravioleta. El mismo procedimiento puede utilizarse también para copolimerizar moléculas con diferentes grupos funcionales.

50 Entre los numerosos métodos utilizados para unir covalentemente enzimas a soportes se encuentra uno que comprende utilizar la reacción de un grupo amino de la enzima con un grupo aldehído del soporte para dar la correspondiente imina que después puede reducirse. Los Ejemplos 4 y 5 ilustran la introducción de grupos aldehído en un soporte.

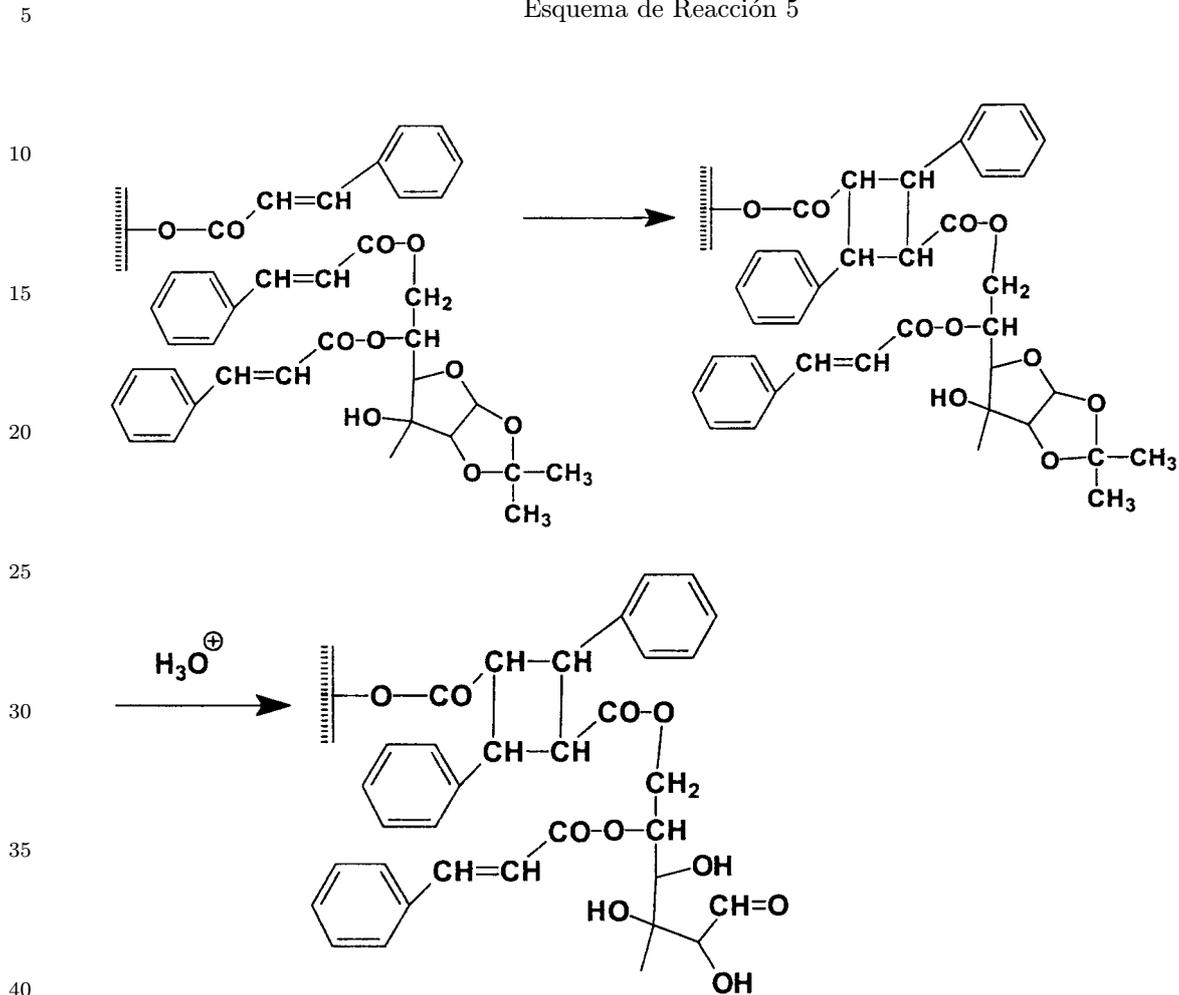
Ejemplo 4

Introducción de grupos aldehído en un soporte

60 Como soportes poliméricos se utilizaron los derivados totalmente cinamoilados de dextrina e inulina, y como ligando que aporta el grupo funcional se preparó el 4,6-dicinnamato de 1,2-diisopropilidén-D-glucofuranosa tal como se menciona en la referencia bibliográfica [2].

La inmovilización se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El producto obtenido se trató con agua acidulada durante una noche para romper el acetal cíclico protector y generar el grupo aldehído libre [véase el Esquema de Reacción 5]).

Esquema de Reacción 5



El producto resultante (soporte funcionalizado con grupos aldehído) dio positivas las pruebas de grupos aldehídos (reacción con fenil hidrazina, reductores, etc.).

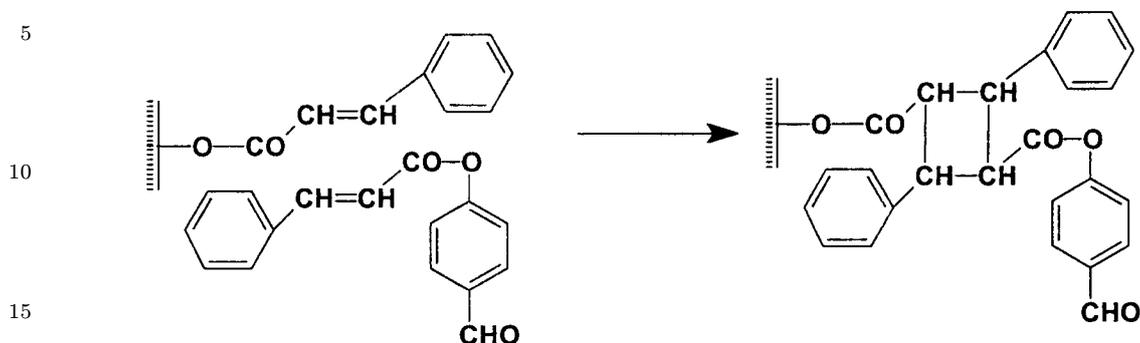
El producto resultante puede ser utilizado para inmovilizar enzimas. Se ha ensayado la inmovilización de una peroxidasa sobre dicho soporte funcionalizado obteniéndose excelentes resultados.

Ejemplo 5

Introducción de grupos aldehído en un soporte

Como soportes poliméricos se utilizaron los derivados totalmente cinamoilados de dextrina e inulina, y como ligando que aporta el grupo funcional se preparó el cinamato de 4-hidroxibenzaldehído. Mediante el procedimiento del Ejemplo 1 se realizó la preparación de los soportes funcionalizados con grupos aldehído [véase el Esquema de Reacción 6].

Esquema de Reacción 6



El producto resultante (soporte funcionalizado con grupos aldehído) dio positivas las pruebas de grupos aldehídos (reacción con fenil hidrazina, reductores, etc.).

El producto resultante puede ser utilizado para inmovilizar enzimas. Se ha ensayado la inmovilización de una peroxidasa sobre dicho soporte funcionalizado obteniéndose excelentes resultados.

III. Generación de soportes para inmovilización por adsorción física y/o atrapamiento covalente

Un buen soporte de adsorción física requiere reunir, entre otras, características adecuadas de hidrofilia o hidrofobia, tamaño molecular, y linealidad o ramificación molecular.

Mediante el procedimiento de esta invención es muy fácil obtener de forma controlada las características del soporte que se desee. Por ejemplo, en ésteres cinámicos derivados de carbohidratos estas características pueden obtenerse de la siguiente manera:

Hidrofilia o hidrofobia: Se obtendrá un soporte más hidrofóbico al aumentar el % de hidroxilos del carbohidrato esterificados como cinamato. El grado de cinamoilación se sigue con gran comodidad mediante diferentes técnicas, por ejemplo, espectroscopia IR ó ^1H RMN.

Tamaño molecular: Se obtendrá mayor tamaño molecular a mayor tiempo de irradiación (grado de entrecruzamiento). Dicho grado de entrecruzamiento se sigue con gran comodidad evaluando el % de enlaces reactivos que quedan después de la reacción por sus bandas en espectroscopia IR ó UV.

Linealidad o ramificación molecular: Se obtendrá un soporte más lineal utilizando un polisacárido lineal de mayor longitud de cadena como soporte base a esterificar. Por el contrario, en el extremo opuesto, si se utilizan derivados totalmente cinamoilados de monosacáridos, por ejemplo, el penta derivado de D-glucosa, de un solo punto pueden partir muchas ramificaciones (5 en el ejemplo) por lo que se obtienen dendrímeros.

Ejemplo 6

Inmovilización de enzimas

Se utilizaron como monómeros a oligomerizar o polimerizar mediante radiación uv todos los cinamatos nombrados previamente, incluso como copolímeros de varios de ellos. Se estudiaron, entre otros, los efectos del tamaño molecular, grado de cinamoilación, grado de entrecruzamiento y tiempo de irradiación sobre la actividad y estabilidad de las enzimas inmovilizadas. Las enzimas utilizadas fueron peroxidasa de rábano (EC.1.11.1.7) de Sigma Chemical Co., tipo VI, suministrada como polvo liofilizado, y β -galactosidasa (EC.3.2.1.23) de Novo Nordisk A/S, suministrada como preparación enzimática líquida. Los resultados obtenidos fueron excelentes.

Ejemplo 7

Eliminación de fenol de aguas residuales

5 Se realizó el siguiente ejemplo para ilustrar una de las muchas aplicaciones prácticas del procedimiento proporcionado por esta invención.

Se sumergieron bolas de vidrio de 3 mm de diámetro en una disolución de 15 g/l de cinamato de inulina en cloroformo y se dejó evaporar el cloroformo de la película líquida que retuvieron al sacarlas. A continuación, las bolas se irradiaron durante 1 minuto y se sumergieron en una disolución de tampón fosfato 0,1 M, pH 7, con una concentración de la enzima peroxidasa de rábano de $1,96 \cdot 10^{-2}$ mg/ml durante 12 horas a 4°C; transcurrido ese tiempo se lavaron durante 1 hora en agua corriente y con ellas se construyó una columna (reactor de lechó fluidizado). Con dicha columna se ensayó la aplicación práctica de eliminación de fenol de aguas residuales. Aguas con contenidos en fenol de 0,5 g/l quedaron libres de fenol con tiempos de circulación a través de esa columna inferiores a 1 hora.

Bibliografía

- [1] Moliner, F., Tesis Doctoral, Universidad de Murcia (1986).
- 20 [2] Solvez Moraga, J.F.; Tesis de Licenciatura, Universidad de Murcia (1985).
- [2a] Montesinos Tormo, María Paz; Tesis de Licenciatura, Universidad de Murcia (1996).
- [3] Minsk, L.M. and VanDeusen, W.P.; patente norteamericana n° US 2.690.966 (1948).
- 25 [4] Williams, J. R.; Laakso, T.M.; Borden, D. G.; solicitud de patente francesa n° 2.058.289 (1971) [Eastman Kodak Co.].
- [5] Delzenne, G.A. ; Recent Advances in Photo-Cross-Linkable Pol. I. Skeist (Ed) - Reviews in Polymer Technology, vol. 1, New York, 1972, 185-215.
- 30 [6] Morawetz, H.; Angew. Chem., 99(2), 95-100 (1987).
- [7] Morawetz, H.; Encycl. Polym. Sci. Eng., 7, 722-45 (1987).
- [8] Bertoniere, N.R.; Franklin, W.E. and Rowland, S.P.; Textile Research Journal, 41(1), 105 (1971).
- 35 [9] Wendell, L.D., Chem. Rev., 83(1), 1 (1983).
- [10] Robertson, E.M.; Van Deusen, W.P. and Minsk, L.M.; J. Appl. Polym. Sci., 11, 308 (1959).
- 40 [11] Tsuda, M.; Nippon Kagaku Kogyo, 18(11-12), 8-12 (1970).
- [12] Tanaka, H.; Tsuda, M.; Nakanishi, H., J. Polym. Sci., Part A-1, 10(6), 1729-43 (1972).
- [13] Unruh, C.C. and Smith, A.C.; J. Appl. Polym. Sci., 3, 310, (1960).
- 45 [14] Arcesi, J.A.; Rauner, F.J.; patente norteamericana US 3.640.722 (1972) [Eastman Kodak CO.].
- [15] Nonogaki, S.; Hashimoto, M.; Iwayanagi, T.; Shirahisi, H.; Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng., 539 (Adv. Resist. Technol. Process. 2), 189-93 (1985).
- 50 [16] Koibuchi, S.; Isobe, A.; Makino, D.; Iwayanagi, T.; Hashimoto, M.; Nonogaki, S.; Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng. 539 (Adv. Resist. Technol. Process. 2), 182-8 (1985).
- [17] Bruno, M.H.; Ed., Pocket Pal. A Graphic Arts Production Handbckok, 13th ed., International paper Co., New York 1983.
- 55 [18] Plambeck, L.; Craincross, A.; Chambers, W.J.; Cleaver, C.S.; Donald, D.S. and Eaton, D.; J. Imaging Sci. 30, 221, 224, 228 (1986).
- [19] "Dialogues in Optics: An interview with Philip Blais on Ultrasmall Dimensions Lithographies", Optical Engineering Reports of SPIE, May 1982.
- 60 [20] Mathauer, K.; Schmidt, A.; Knoll, W. and Wegner, G., Macromolecules, 28(4), 1214 (1995).
- [21] Muenzel, N.; Shultz, R. and Holzworth, H.; solicitud de patente europea EP 599 779 (1994).

ES 2 189 602 B1

- [22] Buhler, N. and Bellus, D.; Pure Appl. Chem. 67(1), 25 (1994).
- [23] Veno, T.; Shiraishi, H.; Uchino, S.; Sakamizu, T. and Halton, T.; J. Photopolym. Sci. Technol. 7(3), 397 (1994).
- 5 [24] Imazu, H.; Hirose, I.; Hioki, M.; Yoshimura, M. and Matsui, M.; solicitud de patente japonesa JP 06,332,170 (1994).
- [25] Tomlinson, W.J. and Chandros, E.A.; Adv. Photochem., 12, 201 (1980).
- 10 [26] Chambers, V.C., Jr.; patente norteamericana n° US 3.497.185 (1969).
- [27] Haugh, E.F.; patente norteamericana n° US 3.658.524 (1972).
- [28] Mohr, G.J. and Wolfbeis, O.S.; Anal. Chim. Acta., 292, 41 (1994).
- 15 [29] Jones, T.P. and Porter, M.D., Anal. Chem., 60, 404 (1988).
- [30] Kostov, L. and Tzonkov, S.; Anal. Chim. Acta., 280, 15 (1993).
- [31] Color research and application; John Wiley & Sons. Inc. 19(5), 377 (1994).
- 20 [32] Rao, B.S.; Puschett, J.B. and Mahjjaszewski, K.; J. Appl. Polym. Sci., 43, 925 (1991).
- [33] Takeshi, I.; Hiroyuki, N. and Hiroko, N.; solicitud de; patente japonesa n° JP 9268194 (1997).
- [34] Katou Mikiko; solicitud de patente japonesa n° JP 4305592:. (1992).
- 25 [35] Kamiya Hiroshi; solicitud de patente japonesa n° JP 7173027 (1995).
- [36] Takeshi, I.; Hiroyuki, N. and Hiroko, N.; solicitud de, patente japonesa n° JP 9263596 (1997).
- 30 [37] Hokazaki Tamomi; solicitud de patente japonesa JP 7010806 (1995).
- [38] Georgalas Artur, C.W; solicitud EP 275 719 (1988).

35

40

45

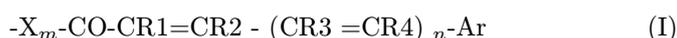
50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la inmovilización de un ligando en un soporte, en el que (i) al menos uno de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático, y (ii) el otro de dichos ligando o soporte contiene, al menos, un doble enlace, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta una mezcla formada por dichos ligando y soporte para generar un anillo de ciclobutano, a partir de los dobles enlaces presentes en dichos ligando y soporte, mediante una reacción de cicloadición fotoquímica 2 + 2, con lo que dicho ligando queda inmovilizado sobre dicho soporte.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ligando se selecciona entre un sustrato, un reactivo, un catalizador, un aditivo, un fármaco, una enzima y un microorganismo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ligando posee, de forma natural o artificial, al menos, un doble enlace.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ligando posee, de forma natural o artificial, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho ligando está derivatizado en forma de un éster del ácido cinámico, o de un análogo del mismo.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho soporte es un oligómero o un polímero, con un peso molecular igual o superior a 500, que posee, de forma natural o artificial, un grupo funcional que contiene, al menos, un doble enlace.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho soporte posee, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho soporte está derivatizado en forma de un éster del ácido cinámico, o de un análogo del mismo.
9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que tanto el ligando como el soporte, contienen cada uno de ellos, al menos, un grupo carbonilo alfa-beta insaturado conjugado con, al menos, un anillo aromático.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que tanto el soporte como el ligando se encuentran en forma sólida.
11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que tanto el soporte como el ligando se encuentran disueltos o suspendidos en unos disolventes apropiados.
12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la irradiación con luz visible o ultravioleta se efectúa con una intensidad de irradiación superior a 5 lux.
13. Un procedimiento para la inmovilización de un ligando en un soporte que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta, una mezcla, que contiene:
- (i) un soporte que comprende, unido a dicho soporte, al menos, un grupo de fórmula general (I)



donde

X es el resto de un grupo funcional presente en el soporte;

R1, R2, R3 y R4, independientemente entre sí, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12, átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más, halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arila, de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

ES 2 189 602 B1

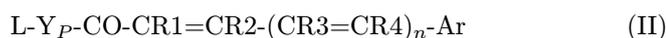
Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbonó opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12. átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂ ;

R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

m es 0 ó 1;

n es 0 ó 1; y

(ii) un ligando de fórmula general (II)



donde

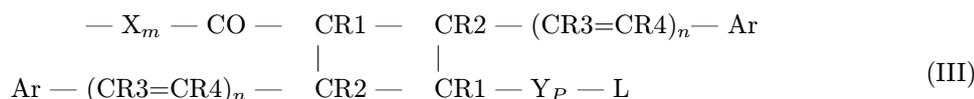
L es el resto de un ligando;

Y es el resto de un grupo funcional presente en el ligando;

p es 0 ó 1; y

R1, R2, R3, R4, Ar y n son los definidos previamente;

para generar un anillo de ciclobutano, mediante una reacción de cicloadición fotoquímica 2+2, y obtener un ligando inmovilizado sobre dicho soporte de fórmula general (III)



donde

X, Y, L, R1, R2, R3, R4, Ar, m, n y p son los definidos previamente.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho ligando se selecciona entre un sustrato, un reactivo, un catalizador, un aditivo, un fármaco, una enzima y un microorganismo.

15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en dicho ligando de fórmula general (II), Y es 0, p es 1, Ar es fenilo opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo o aldehído, n es 0 y R1 y R2 son hidrógeno.

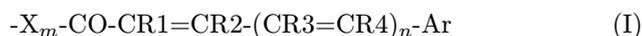
16. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho soporte es un oligómero o un polímero, con un peso molecular igual o superior a 500, que posee, de forma natural o artificial, al menos un grupo de fórmula general (I), en el que X es 0, m es 1, Ar es fenilo, n es 0 y R1 y R2 son hidrógeno.

17. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que tanto el soporte como el ligando se encuentran en forma sólida.

18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que tanto el soporte como el ligando se encuentran disueltos o suspendidos en unos disolventes apropiados.

19. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que la irradiación con luz visible o ultravioleta se efectúa con una intensidad de irradiación superior a 5 lux.

20. Un procedimiento para la generación de un soporte adecuado para la inmovilización de ligandos por adsorción física y/o atrapamiento covalente, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta, a un soporte, en estado sólido, que comprende, unido a dicho soporte, al menos, un grupo de la fórmula general (I)



ES 2 189 602 B1

donde

X es el resto de un grupo funcional presente en el soporte;

5 R1, R2, R3 y R4, independientemente entre sí, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

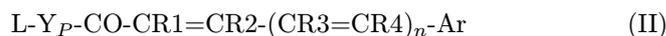
15 Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10, átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

20 m es 0 ó 1; y

n es 0 ó 1.

25 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el soporte generado se hace reaccionar con un ligando de la fórmula general (II)



30 donde

L es el resto de un ligando;

Y es el resto de un grupo funcional presente en el ligando;

35 R1, R2, R3 y R4, independientemente entre si, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

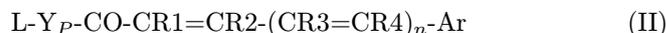
45 Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

50 p es 0 ó 1; y

n es 0 ó 1.

55 22. Un procedimiento para la generación de un ligando adecuado para ser inmovilizado sobre un soporte por adsorción física y/o atrapamiento covalente, que comprende irradiar con luz visible o ultravioleta a un ligando de fórmula general (II)



60 donde

ES 2 189 602 B1

L es el resto de un ligando;

Y es el resto de un grupo funcional presente en el ligando;

5 R1, R2, R3 y R4, independientemente entre sí, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR,
10 -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

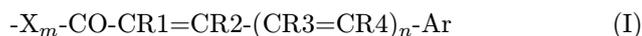
Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo
15 de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

20 p es 0 ó 1; y

n es 0 ó 1.

25 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el ligando generado se hace reaccionar con un soporte que contiene al menos un grupo de fórmula general (I)



30 donde

X es el resto de un grupo funcional presente en el soporte;

35 R1, R2, R3 y R4, independientemente entre sí, iguales o diferentes, representan hidrógeno; halógeno; alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂; o arilo de 5 a 12 átomos de carbono, opcionalmente sustituido por uno o
40 más halógeno, alquilo de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

Ar es arilo de 5 a 12 átomos de carbono opcionalmente sustituido por uno o más halógeno, alquilo
45 de 1 a 10 átomos de carbono, arilo de 5 a 12 átomos de carbono, -CHO, -COOH, -OR, -COR, -COOR, -CONHR, o -CONR₂;

R es hidrógeno, un grupo alquilo de 1 a 10 átomos de carbono o un grupo arilo de 5 a 12 átomos de carbono;

50 m es 0 ó 1; y

n es 0 ó 1.

55

60



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 189 602

② Nº de solicitud: 200002457

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.10.2000

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: B01D 15/08, C12N 11/08

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5563056 A (SWAN et al.) 08.10.1996, reivindicaciones.	1-23
A	WO 8905329 A (GLUETECH) 15.06.1989, reivindicaciones.	1-23
A	BASE DE DATOS CA en STN, AN 118:120343 & H. SIGRIST et al. Biotechnology, Vol. 10, páginas 1026-1028, 1992, "High-dependent, covalent immobilization of biomolecules on inert surfaces". Resumen.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.05.2003

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/1