



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 308 932**

② Número de solicitud: 200701456

⑤ Int. Cl.:

**C07C 237/04** (2006.01)

**C07F 1/08** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 21/77** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **23.05.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.2008**

⑦ Solicitante/s: **Universitat Jaume I**  
**Avda. Vicente Sos Baynat, s/n**  
**12006 Castellón, ES**

⑦ Inventor/es: **Galindo Honrubia, Francisco;**  
**Luis Lafuente, Santiago V.;**  
**Burguete Azcárate, María Isabel y**  
**Vigara Rodríguez, Laura**

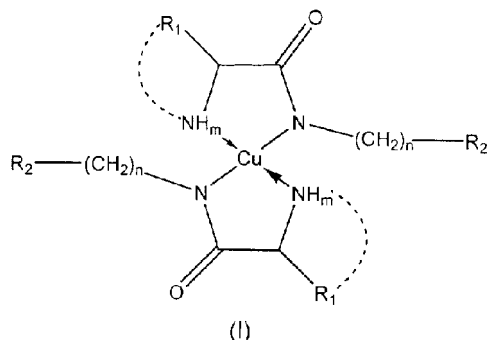
⑦ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑤ Título: **Nuevos sensores químicos fluorescentes para la detección de citrato y ácido cítrico.**

⑤ Resumen:

Nuevos sensores químicos fluorescentes para la detección de citrato y ácido cítrico.

Los compuestos de fórmula (I), donde  $R_1$  es un radical de una cadena lateral de un aminoácido natural; y  $R_2$  es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos de 1-5 anillos; siendo los anillos aromáticos, aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; siendo cada miembro independientemente seleccionado entre C, CH, N, NH, O y S; estando uno o más de los átomos de hidrógeno de estos miembros opcionalmente sustituido por sustituyentes seleccionados entre  $(C_1-C_6)$ -alquilo y  $(C_1-C_6)$ -alcoxilo;  $NH_2$ ; F, Cl, Br; COOM donde M es un metal alcalino o alcalinotérreo; y OH; n es 0 ó 1; m es un entero entre 1 y 2; son sensores fluorescentes selectivos de citrato/ácido cítrico que proporcionan un límite de detección mejorado.



ES 2 308 932 A1

## DESCRIPCIÓN

Nuevos sensores químicos fluorescentes para la detección de citrato y ácido cítrico.

La presente invención se refiere al campo del análisis químico y bioquímico. Más particularmente la presente invención se refiere a nuevos compuestos organometálicos y a su uso como sensores químicos.

## Estado de la técnica anterior

Entre las técnicas empleadas para el análisis de sustancias en disolución se encuentran la espectrometría de masas, frecuentemente acoplada a la cromatografía de gases y de líquidos, y técnicas espectrofotométricas, principalmente de absorción UV-Vis. Más recientemente, se han desarrollado métodos de análisis basados en técnicas mucho más sensibles como es la espectroscopia de fluorescencia o de emisión, del tipo de estado estacionario y resuelta en el tiempo. Estas técnicas basadas en fluorescencia han resultado ser herramientas potentes para la investigación y el análisis en sectores tales como biomedicina, farmacia, medioambiente o la industria de la alimentación.

El análisis de fluorescencia puede proporcionar información de la estructura, movilidad, tamaño macromolecular, distancias o movimientos conformacionales de las moléculas enlazadas a los fluoróforos, gracias a que el proceso de emisión de fluorescencia se da en una escala de tiempo comprendida entre nanosegundos y milisegundos, dependiendo del sistema de fluorescencia utilizado.

Para la utilización de dichas técnicas de fluorescencia se han desarrollado un gran número de sensores fluorescentes o quimiosensores fluorogénicos, capaces de detectar y cuantificar, en muy bajas concentraciones, diferentes analitos (cfr. R. Martínez-Máñez *et al.*, *Chem. Rev.* 2003, vol. 103, pp. 4419-4476; J. F. Callan *et al.*, *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, pp. 8551-8588; A. P. de Silva *et al.*, *Chem. Rev.* 1997, vol. 97, pp.1515-1566; y P.D. Beer *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, vol. 40, pp. 486-516).

Entre los analitos de mayor interés se encuentran los carboxilatos y los policarboxilatos, más particularmente el citrato/ácido cítrico, dado el importante papel que juega en el metabolismo de los seres vivos y su utilidad como componente de numerosos preparados farmacéuticos, alimentos, bebidas y diversos productos industriales.

El citrato/ácido cítrico se utiliza como conservante y acidulante y es necesaria su determinación en frutas y en los productos de alimentación procesados industrialmente; en la industria farmacéutica, donde el citrato/ácido cítrico se utiliza como estabilizante de gran variedad de formulaciones farmacéuticas, como contra-anión para la preparación de principios activos, y en forma de ácido se utiliza en formulaciones efervescentes en combinación con carbonatos y bicarbonatos.

Dada la importancia del citrato/ácido cítrico en el metabolismo de los seres vivos, su determinación es una importante cuestión en investigación biomédica o bioquímica y en medicina clínica. La determinación del ácido cítrico y de sus metabolitos relacionados es de gran utilidad en la investigación del funcionamiento celular y en la detección de niveles patológicos de dichos analitos como elemento de diagnóstico. La determinación del citrato/ácido cítrico, se utiliza para el diagnóstico de diversos desordenes y condiciones patológicas relacionadas con concentraciones anómalas de ácido cítrico/citrato, por ejemplo para la detección de procesos cancerosos como tumores de próstata o para la evaluación de la probabilidad de sufrir cálculos renales, entre otros. Otros usos del citrato en medicina incluyen su utilización como anticoagulante, tanto en experimentos de coagulación como en la conservación de los bancos de sangre.

La determinación de ácido cítrico en medicina se lleva a cabo mediante resonancia magnética nuclear (en el caso del cáncer de próstata) o mediante el método de la citrato liasa (en el caso de los cálculos renales). Adicionalmente, el método conocido de la citrato liasa implica varios pasos, siendo el más largo la reacción entre las enzimas y el ácido cítrico presente en la muestra. Generalmente se ha de esperar de 15 a 20 minutos antes de medir.

En el estado de la técnica se conocen una variedad de sensores fluorescentes para la determinación de carboxilatos, generalmente complejos organometálicos que incluyen grupos fluorescentes o potencialmente fluorescentes. Una aproximación se basa en el diseño de sensores que presentan una especificidad geométrica con el analito. Así, L. A. Cabell *et al.* describen un sensor fluorescente que consiste en Cu (II) coordinado a un ligando 1,10-fenantrolina que está unido a un receptor bis(aminoimidazolio) (cfr. *J.Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, pp. 315-323). C. Schmuck *et al.* describen un receptor guanidiniocarbonil pirrol tricatiónico (cfr. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, vol.127, pp. 3373-3379). También L. Fabrizzi *et al.* describen receptores trifurcados que contienen tres subunidades de ciclama-cobre (II) útiles como sensores para carboxilatos, en particular para citratos (cfr. *Org. Lett.* 2005, vol 7, pp. 2603-2606). Desafortunadamente, se trata de sensores estructuralmente complejos que implican procedimientos de preparación largos y difíciles de llevar a cabo a escala industrial y con rendimientos globales no superiores al 10% en la mayoría de los casos, lo que implica un aumento del coste del sensor. Además, el mecanismo de actuación de dichos sensores se basa en una "reacción de desplazamiento" de un colorante o indicador previamente unido al receptor, el cual al ser desplazado señala la presencia del citrato. Dicho mecanismo es complejo (a: complejación del indicador por el receptor y b: desplazamiento por el citrato) y por tanto susceptible a sufrir interferencias.

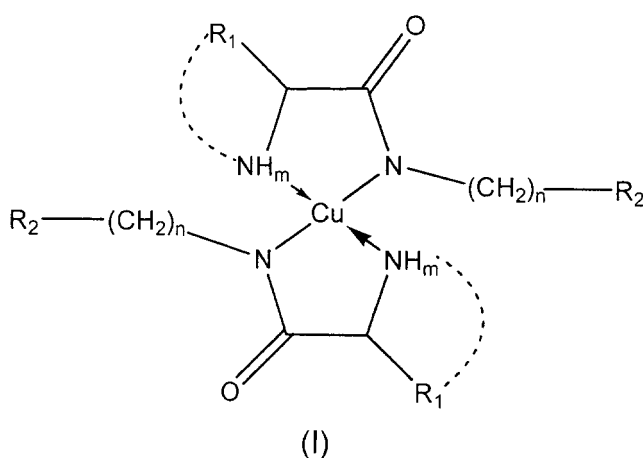
El método actualmente de referencia para la determinación de citrato y ácido cítrico emplea la citrato liasa como enzima que desencadena una serie de reacciones medibles por absorción (cfr. European Standard EN 1137, dec. 1994). Este método de referencia no es adecuado para las aplicaciones en que se necesita una sensibilidad y selectividad altas.

Así, de lo que se conoce en el estado de la técnica, se deduce que sería deseable encontrar nuevos sensores de citratos que sean selectivos, con un límite de detección bajo.

### Descripción de la invención

Los inventores han encontrado un grupo de nuevos compuestos de fórmula (I) que pueden actuar como sensores selectivos de citrato y que proporcionan un límite de detección mejorado. Adicionalmente presentan la ventaja de que su procedimiento de preparación es breve y sencillo y procede con rendimientos globales altos.

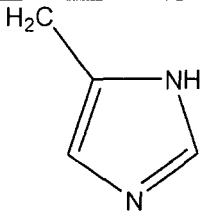
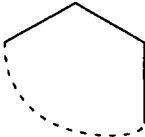
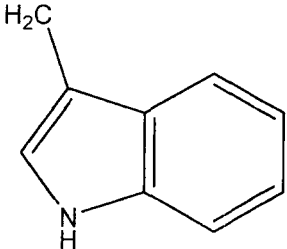
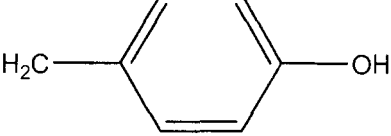
Así en un primer aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I),



donde:  $R_1$  es un radical de una cadena lateral de un aminoácido natural; y  $R_2$  es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos de 1-5 anillos; siendo los anillos aromáticos, aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; siendo cada miembro independientemente seleccionado entre C, CH, N, NH, O y S; estando uno o más de los átomos de hidrógeno de estos miembros opcionalmente sustituido por sustituyentes seleccionados entre el grupo formado por  $(C_1-C_6)$ -alquilo y  $(C_1-C_6)$ -alcoxilo;  $NH_2$ ; F, Cl, Br; COOM donde M es un metal alcalino o alcalinotérreo; y OH; n es 0 ó 1; m es un entero entre 1 y 2; con la condición de que cuando  $R_1$  es una cadena lateral de la prolina, m es 1, y  $R_1$  junto al C al que está unido y el NH forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros.

En la presente invención por cadena lateral de un aminoácido natural se entiende la cadena en la posición a respecto al grupo amino y al grupo carboxilo de un aminoácido existente en la naturaleza. En la siguiente tabla se muestra el nombre, la abreviatura y la cadena lateral  $R_1$  de los aminoácidos naturales más importantes:

TABLA 1

Abreviatura	Nombre completo	Cadena Lateral R
Ala	Alanina	$\text{CH}_3$
Cys	Cisteína	$\text{CH}_2\text{SH}$
Asp	Ácido aspártico	$\text{CH}_2\text{COOH}$
Glu	Ácido glutámico	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
Phe	Fenilalanina	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$
Gly	Glicina	H
His	Histidina	
Ile	Isoleucina	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{CH}_3$
Lys	Lisina	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
Leu	Leucina	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Met	Metionina	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$
Asn	Asparagina	$\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$
Pro	Prolina	
Gln	Glutamina	$\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$
Arg	Arginina	$(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2$
Ser	Serina	$\text{CH}_2\text{OH}$
Thr	Treonina	$\text{CH}_3\text{-CH-OH}$
Val	Valina	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Trp	Triptófano	
Tyr	Tirosina	

En el caso de la prolina, la cadena lateral  $\text{R}_1$  junto al C al que está unida y el NH forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros.

En una realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es aquél donde  $\text{R}_1$  es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado entre fenilalanina y valina.

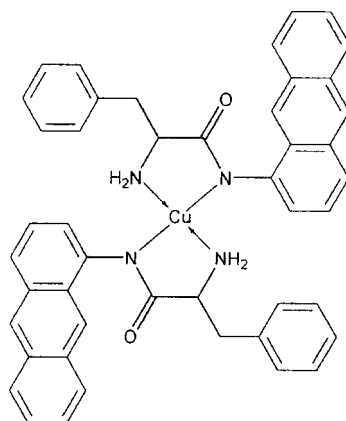
En otra realización preferida, el compuesto de fórmula (I) es aquél donde  $\text{R}_2$  es un C-radical derivado de un sistema de anillo de 2 a 4 anillos. En otra realización todavía más preferida, el sistema de anillo se selecciona entre

## ES 2 308 932 A1

naftaleno, antraceno, acridina, pireno, 2,4,6-trifenil-pirilio, quinolina, 1,10-fenantrolina, estando el sistema de anillo opcionalmente sustituido por (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o NH<sub>2</sub>. En otra realización todavía más preferida, el sistema de anillo es el antraceno.

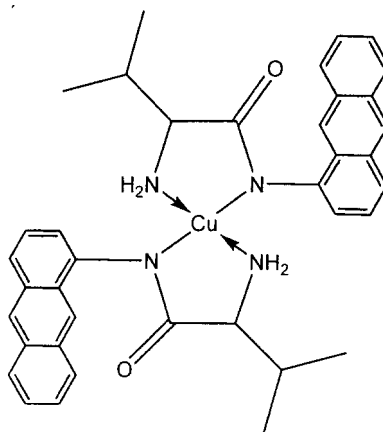
Los compuestos más preferidos son los de la siguiente lista:

(a) compuesto (I) con R<sub>1</sub>= cadena lateral de fenilalanina; R<sub>2</sub>= C-radical derivado de 1-antraceno; m= 2; y n=0;



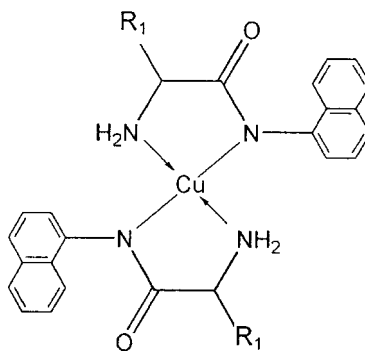
(I<sub>a</sub>)

(b) compuesto (I) con R<sub>1</sub>= cadena lateral de valina; R<sub>2</sub>= C-radical derivado de 1-antraceno; m=2; y n=0;



(I<sub>b</sub>)

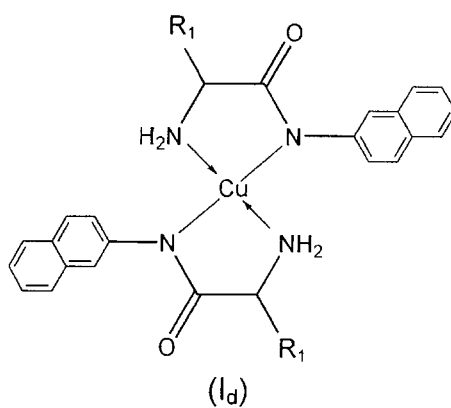
(c) compuesto (I) con R<sub>1</sub>= cadena lateral de fenilalanina; R<sub>2</sub>= C-radical derivado de 1-naftaleno; m=2; y n=0;



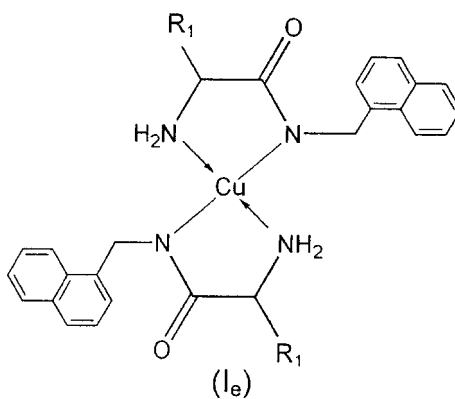
(I<sub>c</sub>)

# ES 2 308 932 A1

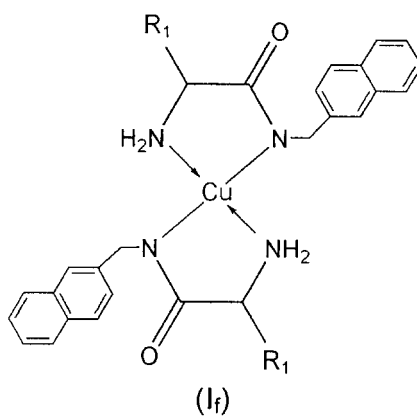
(d) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;



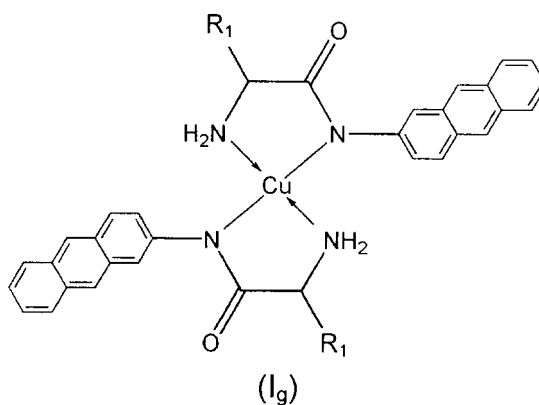
(e) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;



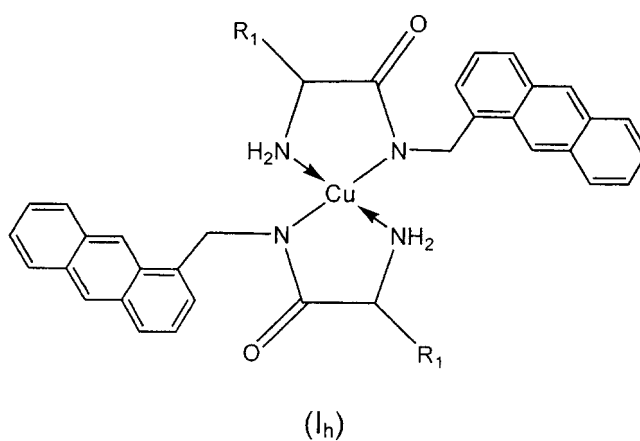
(f) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;



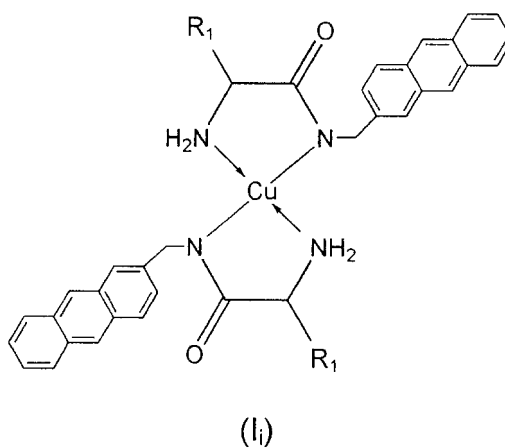
(g) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=0$



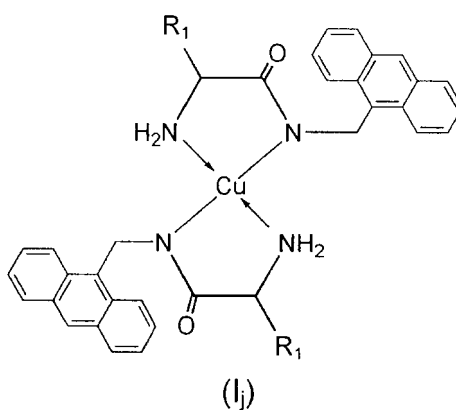
(h) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$



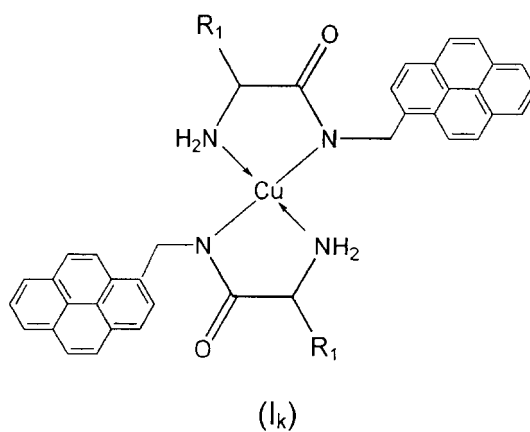
(i) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$



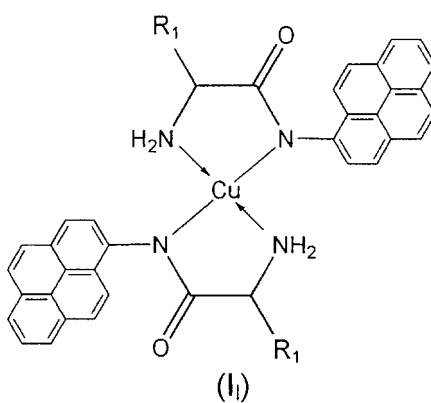
(j) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 10-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$



(k) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-pireno;  $m=2$ ; y  $n=1$

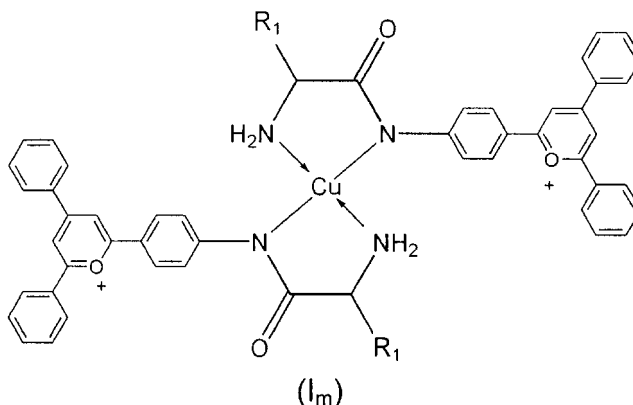


(l) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-pireno;  $m=2$ ; y  $n=0$

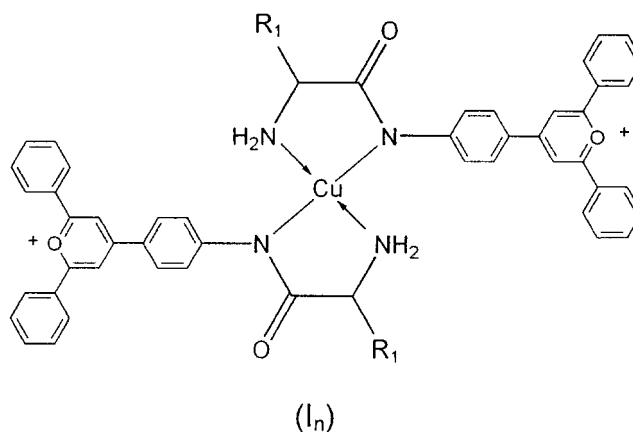




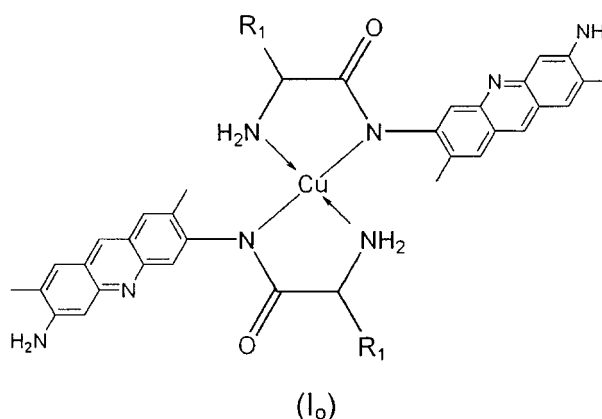
(m) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2,4,6-trifenil-pirilio;  $m=2$ ; y  $n=0$



(n) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2,4,6-trifenil-pirilio;  $m=2$ ; y  $n=0$



(o) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 3,6-diamino-2,7-dimetilacridina;  $m=2$ ; y  $n=0$

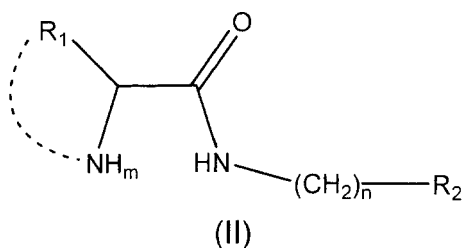


Compuestos de fórmula (I) todavía más preferidos son el compuesto de fórmula (a) y el compuesto de fórmula (b).

Tal como se ha mencionado anteriormente, los compuestos de la presente invención presentan la ventaja de que pueden prepararse mediante procedimientos de preparación sencillos con pocos pasos sintéticos y con rendimientos globales altos. Esto conlleva una disminución del coste de dichos compuestos gracias a un gasto inferior de reactivos, disolventes y mano de obra, así como una mayor facilidad para su fabricación a nivel industrial.

## ES 2 308 932 A1

Así, un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación del complejo de Cu (II) de fórmula (I) que comprende hacer reaccionar al menos dos equivalentes de un ligando de fórmula (II) o una sal del mismo,



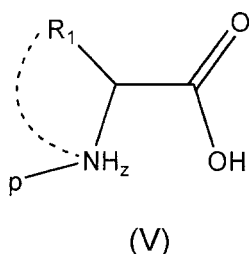
donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, m, y n tienen los valores definidos en la fórmula (I) incluyendo que cuando R<sub>1</sub> es una cadena lateral de la prolina, m es 1, y R<sub>1</sub> junto al C al que está unido y el NH forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros, con una sal de cobre (II) o un hidrato de la misma. Más preferiblemente, la sal de cobre es un haluro de cobre. Todavía más preferiblemente, el haluro de cobre es CuCl<sub>2</sub> o uno de sus hidratos.

Generalmente, los complejos metálicos de formula (I) se preparan con dos equivalente del ligando (L) o de una sal del mismo y un equivalente de sal de cobre. Normalmente, la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente apropiado como por ejemplo agua, metanol, o mezclas de los mismos y en presencia de una base inorgánica, por ejemplo, un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido potásico, y a una temperatura comprendida entre 0°C y la temperatura de reflujo del disolvente utilizado.

Las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el procedimiento varían en función de los parámetros considerados por el experto en la materia, como por ejemplo los productos de partida, la temperatura y similares. Se ajustarán en cada caso para conseguir la máxima cantidad de complejo. Estas condiciones podrán ser fácilmente determinadas por dicho experto en la materia mediante pruebas rutinarias, y con la ayuda de las enseñanzas de los ejemplos presentes en esta memoria.

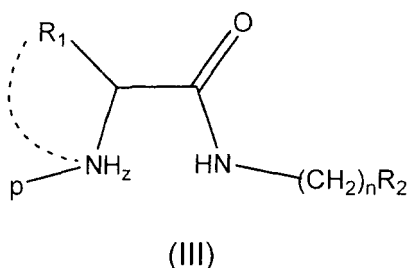
El compuesto de partida de fórmula (II) puede prepararse mediante un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) activar el grupo carboxilo del compuesto de fórmula (V) por reacción con un agente activante;



donde p es un grupo protector de aminas, z es 0 ó 1, y R<sub>1</sub> tiene la misma definición que en la reivindicación 1; con la condición de que cuando R<sub>1</sub> es una cadena lateral de la prolina, Z es 0, y R<sub>1</sub> junto al C al que está unido y el N forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros;

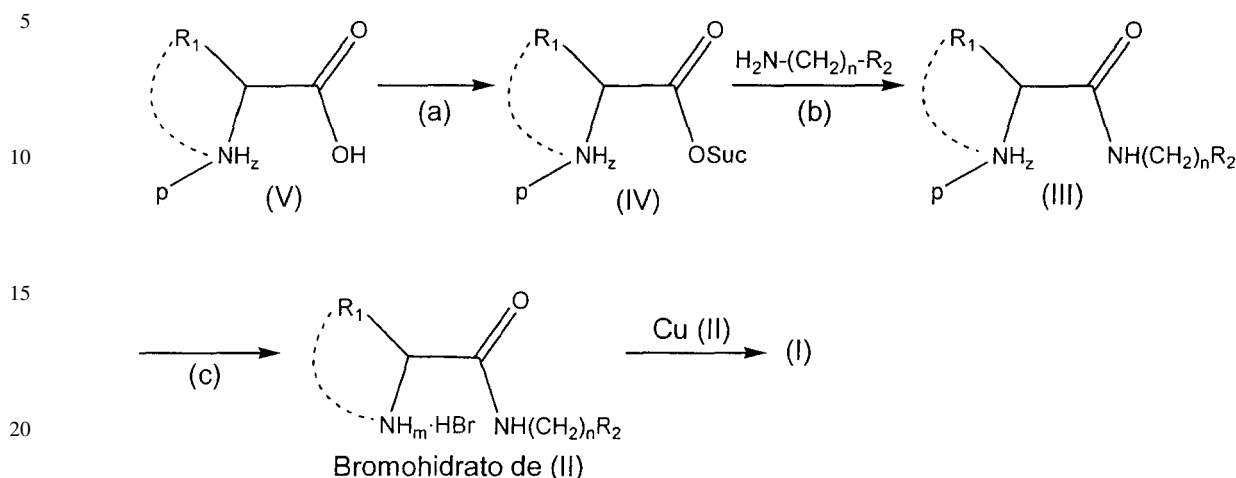
(b) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (a) con un compuesto de fórmula H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>2</sub> para dar el compuesto de fórmula (III), donde p, Z, y R<sub>1</sub>, tienen la misma definición que en la fórmula (V), con la condición de que cuando R<sub>1</sub> es una cadena lateral de la prolina, Z es 0, y R<sub>1</sub> junto al C al que está unido y el N forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros; y R<sub>2</sub> y n tienen los mismos valores definidos para el compuesto de fórmula (I); y



(c) desproteger el compuesto de fórmula (III).

El procedimiento se ilustra en el siguiente Esquema 1:

Esquema 1



La activación del ácido se lleva a cabo con un agente activante que lo modifica para convertirlo en un centro reactivo. La activación del grupo ácido se lleva a cabo mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica (cfr. M. B. Smith, J. March, *March's Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., (2007)), por ejemplo transformando el grupo ácido en haluro de ácido, éster, carbamato, succinato, o en cualquier otro grupo apropiado conocido para la activación del ácido.

Preferiblemente el agente activante es una mezcla de N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida.

Un grupo protector de amina adecuado se selecciona de aquellos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el grupo protector es benciloxicarbonilo, pero para el propósito de la invención se pueden utilizar otros grupos protectores. Asimismo, el grupo protector se puede introducir y eliminar por métodos conocidos en la técnica (cfr. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, (1999)). Las condiciones específicas de reacción dependen del grupo protector utilizado. Por ejemplo, cuando se utiliza el benciloxicarbonilo, este se puede desproteger en condiciones ácidas.

En el caso de que de la etapa (c) resulte una sal del compuesto de fórmula (II), ésta puede utilizarse directamente para la preparación del complejo de cobre, o bien convertirla primero en el compuesto libre.

Aunque todos los nuevos compuestos definidos por la fórmula (I) incluyen un radical fluorescente o potencialmente fluorescente, los complejos de  $\text{Cu (II)}$  de la invención sólo presentan fluorescencia cuando se ponen en contacto con el anión citrato, lo que les permite que puedan ser utilizados como sensores. Se ha observado que además son altamente selectivos frente a citrato, ya que las soluciones de los sensores de la presente invención con otros carboxilatos diferentes al citrato, por ejemplo acetato, malato, glutarato, malonato, succinato, tartrato, lactato, benzoato, ftalato, fumarato o maleato, no presentan una fluorescencia significativa. La selectividad se basa en la capacidad del citrato de liberar el ligando presente en el complejo de fórmula (I).

Así, un aspecto adicional de la presente invención es el uso del complejo de  $\text{Cu (II)}$  de fórmula (I) como sensores fluorescentes de citrato/ácido cítrico. El uso de los sensores de fórmula (I) como sensores químicos para la detección de citrato/ácido cítrico proporciona una selectividad frente a otros carboxilatos y tricarboxilatos mejorada, además de un límite de detección de citrato muy favorable, ya que su rango de sensibilidad y de cuantificación se sitúa en concentraciones de orden micromolar ( $10^{-6}$  M).

Dicha selectividad y sensibilidad mejoradas se deben a un incremento de la intensidad de fluorescencia de hasta el 1500% en las soluciones de los sensores de la presente invención al ponerse en contacto con el ión citrato. Este dato conlleva que, en presencia de citrato, la señal se multiplica por un factor de 15 en comparación con la señal medida en una solución de sensores en ausencia de citrato.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al procedimiento para la determinación de citrato/ácido cítrico que comprende las etapas de:

(a) preparar una curva de calibrado a partir de soluciones de citrato de concentraciones conocidas;

(b) poner en contacto la muestra a analizar con el complejo de  $\text{Cu (II)}$  de fórmula (I) a un pH mayor o igual a 7,5;

(c) medir la fluorescencia de la muestra y determinar el contenido de citrato usando la curva de calibrado.

La preparación de la curva de calibrado puede realizarse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Así, la curva de calibrado puede prepararse a partir de soluciones de citrato de diferentes concentraciones conocidas, las cuales se ponen en contacto con el sensor de la presente invención y posteriormente se mide la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas con un espectrofluorímetro. Mediante las diversas técnicas de regresión conocidas se relacionan los datos de concentración con la intensidad de señal y se construye un algoritmo útil para la determinación de la concentración de citrato en función de la intensidad de la fluorescencia de la muestra. Más concretamente el intervalo de la curva de calibrado que se utiliza para la determinación es aquél en el que la relación entre la intensidad de señal fluorescente y la concentración es lineal. En este caso, para el ajuste de los datos se utiliza la siguiente expresión:

$$I_F = a + b \cdot c$$

donde:

$I_F$  es la intensidad de fluorescencia

$c$  es la concentración de citrato

$a$  y  $b$  son la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente, de la recta resultante del ajuste de los datos.

Para la determinación de citrato/ácido cítrico de una muestra problema se pone en contacto la solución de sensor con la muestra problema, opcionalmente tratada y preparada previamente para poder ser analizada, y se mide la intensidad de fluorescencia emitida. El resultado se obtiene mediante el algoritmo previamente establecido.

En el caso de que el pH de la muestra sea inferior a aproximadamente 7,5, se trata con una cantidad adecuada para llevarla a un pH mayor o igual a aproximadamente 7,5 para llevar a cabo la medición.

Los sensores de la presente invención pueden utilizarse en diversos sectores. Dichos sectores incluyen la industria de alimentación; la industria farmacéutica; biomedicina, bioquímica y medicina clínica.

Los complejos de la invención proporcionan la sensibilidad y selectividad apropiadas para, mediante la determinación del citrato/ácido cítrico, el diagnóstico de diversos desordenes y condiciones patológicas relacionadas con concentraciones anómalas de ácido cítrico/citrato, por ejemplo para la detección de procesos cancerosos como tumores de próstata o para la evaluación de la probabilidad de sufrir cálculos renales, entre otros. A diferencia de los métodos conocidos en el estado de la técnica, el método de la presente invención proporciona un análisis mejorado en su sensibilidad, rapidez y sencillez. Por ejemplo, la sensibilidad del método de la presente invención es entre cien y mil veces mayor que el método de la citrato liasa, que es el método estándar para la determinación de citrato y ácido cítrico de la Unión Europea (cfr. European Standard EN 1137, dec. 1994).

A diferencia del método de la citrato liasa que implica varios pasos y generalmente se ha de esperar de 15 a 20 minutos antes de medir, en el caso de los complejos de la presente invención, la reacción ocurre prácticamente de manera instantánea, o al menos durante el tiempo que se tarda en mezclar sensor y la muestra problema (1-2 segundos). La ventaja de la rapidez del método de la presente invención es de gran importancia a la hora de desarrollar sistemas automáticos de medición en tiempo real, como por ejemplo los requeridos en a) control de calidad alimentario (con objeto de detectar a tiempo posibles fallos en la calidad de fabricación de un producto), o b) análisis médicos urgentes para el diagnóstico rápido de enfermedades ligadas a la presencia de citrato o ácido cítrico en fluidos, como por ejemplo orina o sangre, o en tejidos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

Fig.1: muestra las curvas de absorción y fluorescencia del ligando libre y del complejo. Las curvas a y b son curvas de absorción, la curva b corresponde al ligando libre de fórmula (II) (con  $R_1 = \text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_6$ ,  $R_2 = 1\text{-antraceno}$ ,  $m = 2$ ,  $n = 0$ ) y la curva a corresponde al correspondiente complejo de fórmula (I); y las curvas c y d son las curvas de fluorescencia, la curva c corresponde a dicho complejo y la curva d corresponde a su respectivo ligando libre; donde A representa la absorbancia, I la intensidad de la emisión de fluorescencia y L la longitud de onda en nm.

Fig.2: muestra las diferentes curvas de emisión del complejo en función de la concentración de citrato, donde I representa la intensidad de la emisión de fluorescencia, C la concentración de citrato y L la longitud de onda en nm.

Fig.3: muestra la curva de calibrado de la intensidad de fluorescencia a 418 nm frente a concentración de citrato según el método de la presente invención (línea sólida) en comparación con los resultados de la medición mediante el método de la citrato-lias (línea discontinua), donde A representa la absorbancia, I la intensidad de la emisión de fluorescencia y C la concentración de citrato en  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Fig.4: muestra la curva de calibrado en la zona de respuesta lineal ( $0,1\text{-}10\ \mu\text{M}$ ), con un coeficiente de correlación de  $R=0,99792$ .

## Ejemplos

### Ejemplo 1

*Preparación de bis(2-amino-N-(antracen-1-il)-3-fenilpropanamidato) de cobre (II) (Fórmula (I) con  $R_1 = \text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_6$ ,  $R_2 = \text{C-radical derivado de 1-antraceno}$ )*

(a) En un matraz de 500 ml se introdujeron (25,8 g, 86,0 mmol) de benciloxicarbonil-L-fenilalanina junto con 10,2 g (86,0 mmol) de N-hidroxisuccinimida. La mezcla se disolvió en 250 ml de THF seco y se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ . Gota a gota, se adicionó una disolución de 20,50 g (98,36 mmoles) de diclohexilcarbodiimida (DCC) en 100 ml de THE seco, y la mezcla de reacción se mantuvo durante un periodo de 5 h a una temperatura entre  $0\text{-}5^\circ\text{C}$ . Trascurrido este tiempo, la urea formada se separó por filtración y el filtrado se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante recristalización en 2-propanol (rendimiento: 86% de compuesto obtenido de fórmula (IV) con  $p = \text{BzO}$ ,  $R_1 = \text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_6$ ).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,96 (t, 3H), 1,59 (m, 2H,  $j=14,2$ , 6,6 Hz), 3,20 (dd, 2H,  $j=14,2$ , 5,6 Hz), 5,00-5,13 (m, 3H), 5,39 (d, 1H,  $j=8,6$  Hz), 7,24-7,38 (m, 10H); IR (KBr) 3297, 1814, 1785, 1747, 1679, 1541  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS  $m/z=419,1$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ). Análisis Elemental calculado ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ ): C 63,6; H 5,1; N 7,1; Encontrado: C 63,5; H 5,5; N 7,4.

(b) El compuesto obtenido en la etapa (a) (5,0 g, 12,6 mmol) se disolvió en THE anhidro (40 mL) y a esa disolución se le añadió otra de 1-aminoantraceno (2,7 g, 12,6 mmol) en THE (10 ml). Tras reflujo de 18 h bajo atmósfera de nitrógeno se filtró y evaporó a presión reducida. El sólido obtenido se lavó con agua básica, agua neutra y 2-propanol caliente. El producto se secó en estufa a presión reducida (temp.  $60\text{-}70^\circ\text{C}$ ) durante 24 h para dar el compuesto de fórmula (III) con  $n=0$ ,  $p = \text{BzO}$ ,  $R_2 = 1\text{-antraceno}$ ,  $R_1 = \text{CH}_2\text{C}_5\text{H}_6$  (rendimiento: 70%).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO)  $\delta$  3,04 (dd, 1H,  $j=9,7$  Hz,  $j'=12,7$  Hz), 3,22 (dd, 1H,  $j=5,5$  Hz,  $j'=13,4$  Hz), 4,75 (m, 1H), 5,06 (s, 2H), 7,25 (m, 1H), 7,33 (m, 1H), 7,43 (d, 6H,  $j=7,1$  Hz), 7,50 (t, 2H,  $j=7,8$  Hz), 7,54 (dd, 2H,  $j=2,9$  Hz,  $j'=6,4$  Hz), 7,61 (d, 1H,  $j=7,0$  Hz), 7,80 (d, 1H,  $j=8,0$  Hz), 7,95 (d, 1H,  $j=8,5$  Hz), 8,00 (m, 1H), 8,53 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 10,20 (s, 1H); IR (KBr) 3269, 1684, 1653, 1531  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS  $m/z=497,2$  ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 513,3 ( $\text{M}+\text{K}^+$ ).

(c) A 3,0 g (6,3 mmol) del compuesto obtenido en la etapa (b) se añadieron 14 ml de HBr/AcOH (33%) y la mezcla se agitó durante 50 minutos. Se añadió éter dietílico lo que condujo a la aparición de un precipitado verde. Se filtró y lavó con éter dietílico. El sólido obtenido se secó a vacío y a  $60\text{-}70^\circ\text{C}$  durante 24 h para dar el bromohidrato del compuesto de fórmula (II) (rendimiento: 97%).  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DMSO)  $\delta$  3,28 (m, 1H), 3,40 (bs, 1H), 4,55 (s, 1H), 7,33 (m, 1H), 7,40 (m, 4H), 7,51 (t, 1H,  $j=7,8$  Hz), 7,57 (m, 2H), 7,61 (d, 1H,  $j=7,1$  Hz), 7,98 (d, 1H,  $j=8,5$  Hz), 8,00 (d, 1H,  $j=8,0$  Hz), 8,10 (d, 1H,  $j=8,0$  Hz), 8,27 (s, 1H), 8,50 (bs, 3H), 8,61 (s, 1H), 10,45 (s, 1H); IR (KBr) 3425 3028 1665 1549  $\text{cm}^{-1}$ . ESI-MS  $m/z=341,3$  ( $\text{M}^+-\text{Br}^-$ ).

(d) El compuesto del título se preparó disolviendo 0,427 mmol del compuesto obtenido en la etapa (c) y 0,214 mmol de  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en MeOH. Tras la mezcla de dichas disoluciones no hay cambio de color apreciable. Se añadieron 0,854 mmol de KOH a la disolución y se observó un oscurecimiento de la mezcla final tras disolverse la base. Se puso la mezcla a reflujo 1 h y al cabo de dicho tiempo se evaporó el disolvente y se lavó con agua. Tras secado en estufa a vacío ( $65^\circ\text{C}$ ) durante 20 h se obtuvo un sólido verde oscuro con un rendimiento del 51%. El complejo obtenido se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja, espectrofotometría de absorción y fluorescencia. El espectro FT-IR del compuesto del título preparado mediante el procedimiento de la invención muestra una banda de vibración de carbonilo en 1591  $\text{cm}^{-1}$ . El espectro de UV-Vis (agua:metanol, 3:7 v/v, pH=8) del complejo muestra máximos de absorción en las longitudes de onda de 350, 367 y 384 nm. El espectro de emisión de fluorescencia del compuesto (agua:metanol, 3:7 v/v, pH=8) con una longitud de onda de excitación de 370 nm, muestra un máximo de emisión a 418 nm.

La comparación entre los espectros de FT-IR de ligando libre (compuesto de la etapa (c)) y del complejo del título obtenido en la etapa (d) muestra un gran desplazamiento de la banda de vibración de carbonilo, desde 1663  $\text{cm}^{-1}$  en el ligando hasta 1591  $\text{cm}^{-1}$  en el complejo. Una comparación entre los espectros de UV-Vis (en agua:metanol, 3:7 v/v, pH 8) de ligando libre y del complejo permite apreciar tanto desplazamientos de la banda de absorción del ligando a 320-400 nm como disminución de la intensidad de emisión en el complejo respecto al ligando libre (cfr. Fig. 1).

## Ejemplo 2

*Procedimiento de utilización del complejo de fórmula (I) como sensor de citrato*a) *Preparación de la curva de calibrado*

La curva de calibrado se obtiene utilizando 30 ml de una disolución no fluorescente del complejo (concentración del complejo =  $2 \times 10^{-5}$  M, NaCl 0,15 M, metanol:agua 7:3 v/v, a pH=7,9), a la que se le añaden alícuotas de entre 5 y 200 microlitros de una disolución de citrato sódico (concentración de citrato =  $1,5 \times 10^{-3}$  M, NaCl 0,15M, agua) y ajustando el pH a 7,9 tras cada una de las adiciones. De este modo se aumenta la concentración de citrato en la disolución desde 0 a 100 micromolar. Debido a ello se produce un incremento de la emisión a 418 nm (cfr. Fig. 2), que permite relacionarla señal de emisión fluorescente con la concentración de citrato presente en el medio de disolución (cfr. Fig. 4). Para la medida de la emisión de fluorescencia se empleó un espectrofotómetro Spex Fluorolog 3 equipado con una lámpara de xenón de 450 W, excitando a 370 nm y registrando la emisión entre 380 y 550 nm. En concreto, de la curva de calibrado se utiliza el rango de concentración 0,1 – 10 micromolar, en el cual la relación entre la intensidad de señal fluorescente y la concentración de señal es lineal. Se estima un límite de detección de aproximadamente 1 micromolar de citrato. En la Fig. 3 se ha representado en escala logarítmica la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la concentración de citrato presente en el medio (trazo más grueso).

En la Fig. 3 se comparan dichos resultados con los que resultan de aplicar el método actualmente de referencia, trazo más fino y punteado, para la determinación de citrato y ácido cítrico, método que emplea la citrato liasa como enzima que desencadena una serie de reacciones medibles por absorción (cfr. European Standard EN 1137, dec. 1994).

La sensibilidad de la determinación usando el complejo de fórmula (I) frente a citrato es más de cien veces superior que utilizando el método de referencia.

b) *Determinación de citrato*: la determinación de citrato se llevó a cabo midiendo por triplicado la fluorescencia de cinco muestras de concentración conocida de citrato (por pesada de citrato sódico y disolución en un volumen dado). Se ha utilizado la curva de calibrado de la Fig.3 para determinar la concentración de cada muestra y evaluar la precisión del método.

Los resultados se han incluido en la Tabla 2.

TABLA 2

Muestra	Concentración real (micromolar)	Concentración determinada con (A) (micromolar) <sup>1</sup>
1	3,2	2,8
2	4,3	4,5
3	6,6	7,1
4	8,9	8,2
5	9,0	9,1

El ensayo descrito demuestra la utilidad del complejo de fórmula (I) con R<sub>1</sub>=cadena lateral de fenilalanina para la cuantificación del anión citrato mediante fluorescencia en el rango micromolar en disoluciones acuosas.

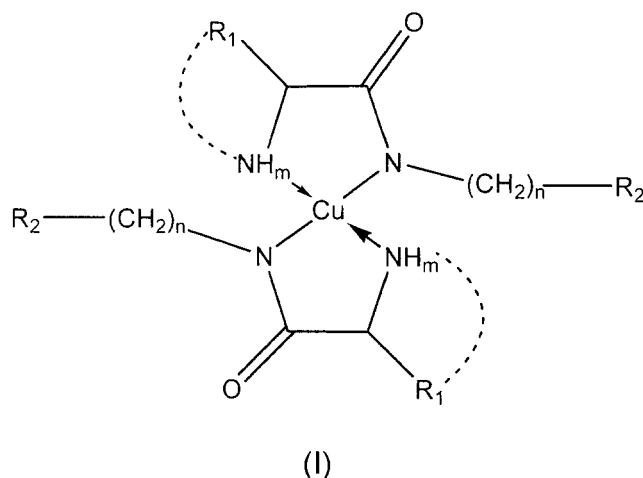
## Ejemplo 3

*Estudio de selectividad frente a citrato*

El complejo arriba mencionado es sensible selectivamente frente a citrato y no frente a otros carboxilatos biológicamente relevantes, utilizando idéntica metodología. Así, se ensayaron los ácidos siguientes (en forma de carboxilatos) en las mismas condiciones arriba indicadas sin apreciarse un cambio importante de la fluorescencia: acetato, malato, glutarato, malonato, succinato, tartrato, lactato, benzoato, ftalato, fumarato y maleato. Las variaciones de intensidad de fluorescencia en presencia de dichos carboxilatos fueron inferiores al 10% de la variación de intensidad experimentada en presencia de citrato.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I),



donde:

$R_1$  es un radical de una cadena lateral de un aminoácido natural; y

$R_2$  es un C-radical derivado de uno de los sistemas de anillo conocidos de 1-5 anillos; siendo los anillos aromáticos, aislados o parcialmente/totalmente fusionados y teniendo 5-6 miembros; siendo cada miembro independientemente seleccionado entre C, CH, N, NH, O y S; estando uno o más de los átomos de hidrógeno de estos miembros opcionalmente sustituido por sustituyentes seleccionados entre el grupo formado por (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo y (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alcoxilo; NH<sub>2</sub>; F, Cl, Br; COOM donde M es un metal alcalino o alcalinotérreo; y OH;

$n$  es 0 ó 1;

$m$  es un entero entre 1 y 2;

con la condición de que cuando  $R_1$  es una cadena lateral de la prolina,  $m$  es 1, y  $R_1$  junto al C al que está unido y el NH forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde el sistema de anillo de  $R_2$  tiene entre 2-4 anillos.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde  $R_1$  es la cadena lateral de un aminoácido seleccionado entre fenilalanina y valina.

4. Compuesto según la cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde  $R_2$  es un C-radical derivado de un sistema de anillo seleccionado entre el grupo que consiste en naftaleno, antraceno, acridina, pireno, 2,4,6-trifenil-pirilio, quinolina, 1,10-fenantrolina, estando el sistema de anillo opcionalmente sustituido por (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alquilo o NH<sub>2</sub>.

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde el sistema de anillo es antraceno.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se selecciona de la siguiente lista:

(a) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

(b) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de valina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

(c) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

(d) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

(e) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

(f) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-naftaleno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

(g) compuesto (I) con  $R_1$ = cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

## ES 2 308 932 A1

(h) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

(i) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

5 (j) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 10-antraceno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

(k) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-pireno;  $m=2$ ; y  $n=1$ ;

(l) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 1-pireno;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

10 (m) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2,4,6-trifenil-pirilio;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

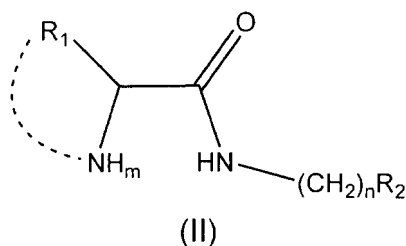
15 (n) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 2,4,6-trifenil-pirilio;  $m=2$ ; y  $n=0$ ;

(o) compuesto (I) con  $R_1$ =cadena lateral de fenilalanina;  $R_2$ = C-radical derivado de 3,6-diamino-2,7-dimetilacridina;  $m=2$ ; y  $n=0$ .

20 7. Procedimiento de preparación del compuesto de fórmula (I) definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende hacer reaccionar al menos dos equivalentes de un ligando de fórmula (II) o una sal del mismo,

25

30



35

40 donde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $m$ , y  $n$  tienen los valores definidos en la reivindicación 1, con la condición de que cuando  $R_1$  es una cadena lateral de la prolina,  $m=1$ , y  $R_1$  junto al C al que está unido y el NH forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros, con una sal de cobre (II) en presencia de una base inorgánica.

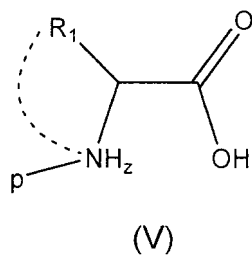
8. Procedimiento de preparación según la reivindicación 7, donde la sal de cobre es  $CuCl_2$  o un hidrato del mismo.

45 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde previamente se prepara el ligando de fórmula (II) por un proceso que comprende las etapas de:

(a) activar el grupo carboxilo del compuesto de fórmula (V) por reacción con un agente activante;

50

55



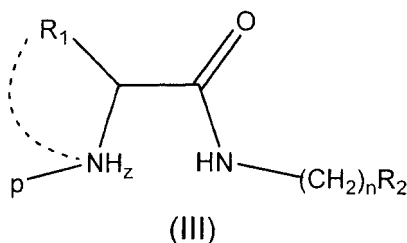
60

65 donde  $p$  es un grupo protector de aminos,  $z$  es un entero entre 0 y 1, y  $R_1$  tiene la misma definición que en la reivindicación 1; con la condición de que cuando  $R_1$  es una cadena lateral de la prolina,  $Z$  es 0, y  $R_1$  junto al C al que está unido y el N forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros;



## ES 2 308 932 A1

(b) hacer reaccionar el compuesto obtenido en la etapa (a) con un compuesto de fórmula  $H_2N-(CH_2)_n-R_2$ , para dar el compuesto de fórmula (III), donde p, Z, y  $R_1$ , tienen la misma definición que en la fórmula (V), con la condición de que cuando  $R_1$  es una cadena lateral de la prolina, Z es 0, y  $R_1$  junto al C al que está unido y el N forman conjuntamente un ciclo de 5 miembros; y  $R_2$  y n tienen los mismos valores definidos para el compuesto de fórmula (I); y



(c) desproteger el compuesto de fórmula (III).

10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde el agente activante es una mezcla de N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida.

11. Uso del compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, como sensor fluorescente de citrato/ácido cítrico.

12. Procedimiento para la determinación de citrato/ácido cítrico que comprende las etapas de:

(a) Preparar una curva de calibrado a partir de soluciones de citrato de concentraciones conocidas;

(b) Poner en contacto la muestra a analizar con el compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 a un pH mayor o igual a aproximadamente 7,5; y

(c) medir la fluorescencia de la muestra y determinar el contenido de citrato usando la curva de medición.

FIG. 1

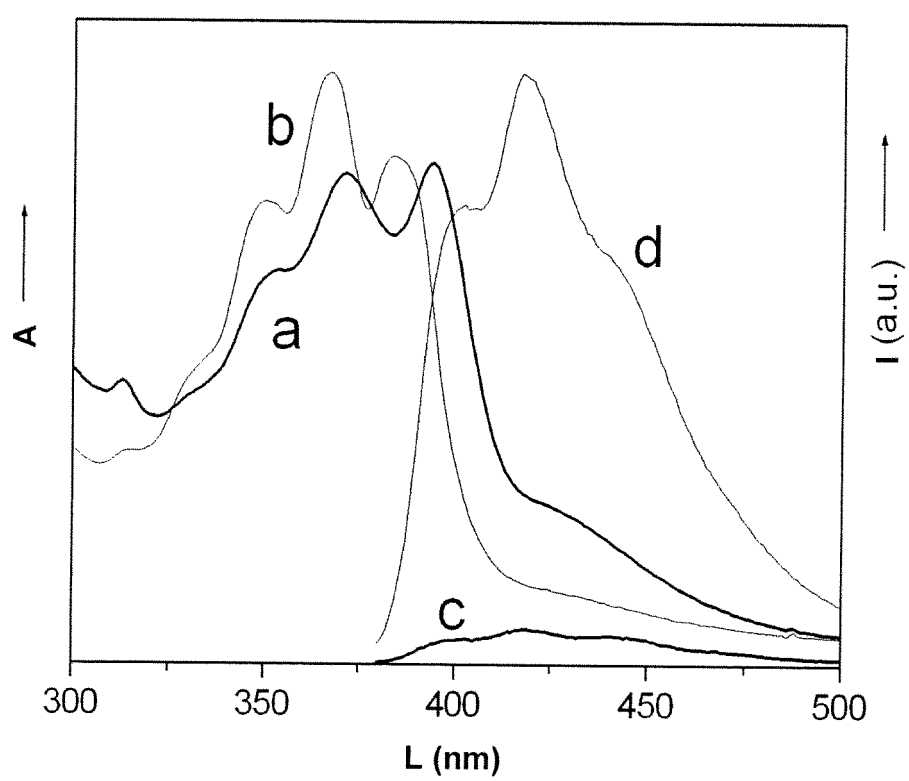


FIG. 2

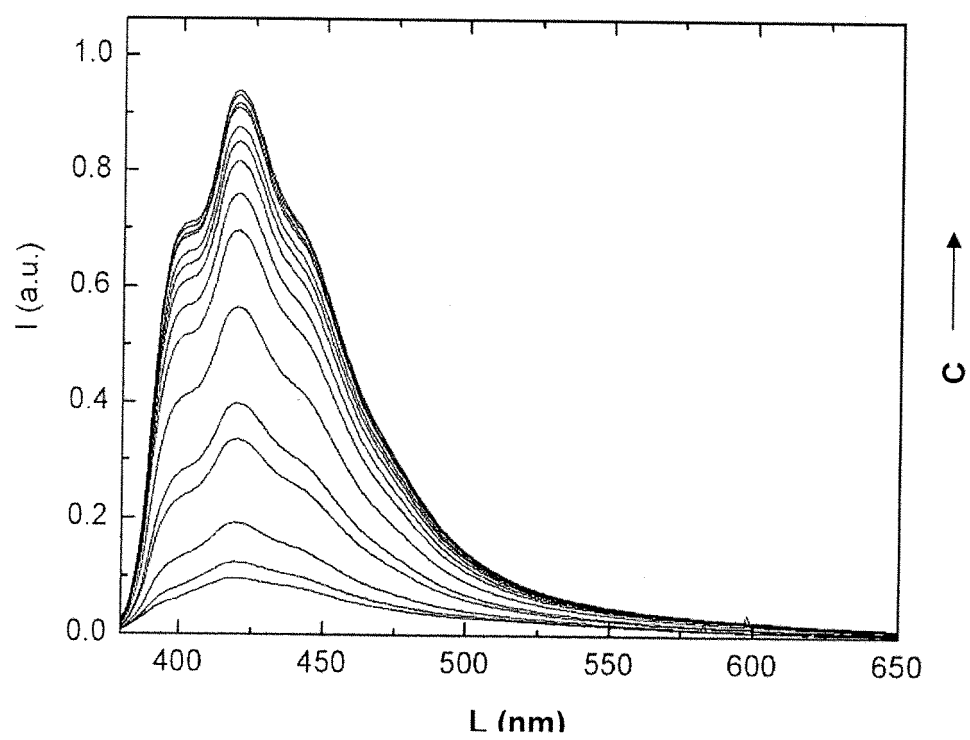


FIG. 3

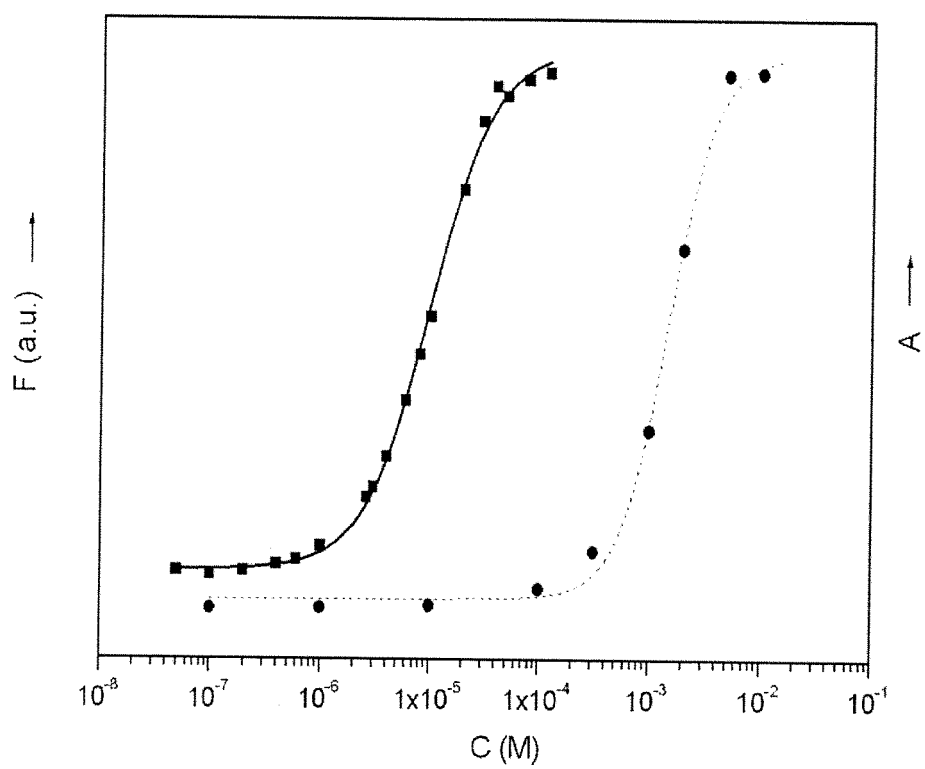
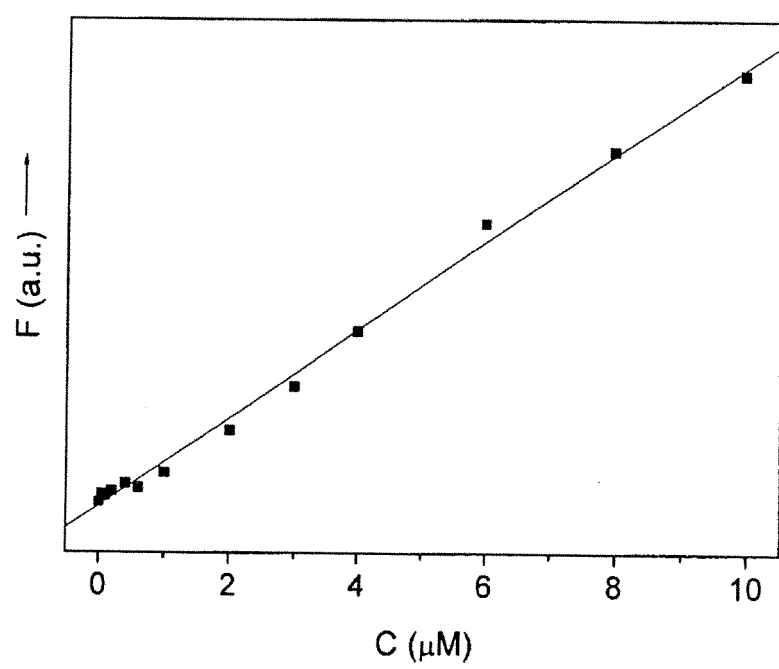


FIG. 4





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 308 932

⑫ Nº de solicitud: 200701456

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 23.05.2007

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KRONECK, P.M.H. et al. "Model Studies on the Coordination of Copper In Biological Systems". European Journal of Biochemistry, 1980, Volumen 109, Número 2, páginas 603-612. Ver página 606, tabla 1; página 604, ecuación 1; página 607, figura 1.	1,7
Y		8-10
Y	BURGUETE, M.I. et al. "Nickel complexes from $\alpha$ -amino amides as efficient catalysts for the enantioselective $\text{Et}_2\text{Zn}$ addition to benzaldehyde". Tetrahedron Letters, 2003, Volumen 4, Número 36, páginas 6891-6894. Ver página 6892, esquema 2, tabla 1.	8-10
A	KOMORITA, T. et al. "Metal complexes with Amino Acid Amides. III. Geometrical Structures and Electronic Spectra of Bis( $\alpha$ -amino-acid-amidato)palladium (II), -nickel (II) and -copper (II)". Bulletin of the American Society of Japan, 1971, Volumen 44, páginas 3353-3363. Ver página 3355, columna 2, apartado 10.	1-10
A	US 6200744 B1 (SASAKI, H. & TAKEUCHI, H.) 13.03.2001, columna 7 compuestos I-9 y I-13.	1
A	KRÄMER, R. "Fluorescent Chemosensors for $\text{Cu}^{2+}$ Ions: Fast, Selective and Highly Sensitive". Angewandte Chemie International Edition, 1998, Volumen 37, Número 6, páginas 772-773. Ver esquema 1.	1-12
A	FABBRIZZI, L. et al. "Metal-Containing Trifurcate Receptor that Recognizes and Senses Citrate in Water". Organic Letters, 2005, Volumen 7, Número 13, páginas 2603-2606.	11,12

#### 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  
08.09.2008

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07C 237/04** (2006.01)

**C07F 1/08** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 21/77** (2006.01)