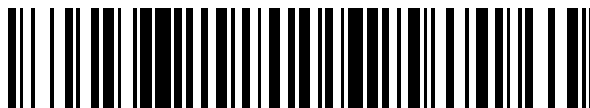


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 254**

21 Número de solicitud: 201230148

51 Int. Cl.:

C08G 83/00 (2006.01)

C07F 7/08 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.02.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.08.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

MARINA ALEGRE, M^a Luisa;
DE LA MATA DE LA MATA, Francisco Javier;
GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;
GARCÍA RUIZ, Carmen;
MONTEALEGRE DONDARZA, Cristina y
RASINES MORENO, Beatriz

54 Título: **Uso de dendrímeros carbosilanos aniónicos para la separación de proteínas**

57 Resumen:

Uso de dendrímeros carbosilanos aniónicos para la separación de proteínas.

La invención se refiere al uso de dendrímeros carbosilanos aniónicos como nanoaditivos en electroforesis capilar para la separación de proteínas, más preferiblemente para la obtención de perfiles proteicos y aún más preferiblemente para la identificación de alimentos.

ES 2 417 254 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de dendrímeros carbosilanos anionicos para la separación de proteínas.

5 La presente invención se refiere al uso de dendrímeros aniónicos como nanoaditivos en electroforesis capilar (CE) para la separación de proteínas, más concretamente para la obtención de perfiles proteicos que resultan de utilidad en la caracterización de alimentos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 La CE es una técnica de análisis poderosa debido a su aplicabilidad en el análisis de grandes macromoléculas como las proteínas en el campo alimentario. Los estudios dedicados al análisis de las proteínas de los alimentos por CE se han centrado en el análisis cuantitativo de las proteínas más importantes a nivel nutricional en diferentes productos alimenticios así como en el análisis de proteínas para determinar la calidad y autenticidad de un alimento. Además, este análisis por CE ha permitido la detección de adulteraciones y la identificación de variedades de diferentes cultivos.

15 En este contexto, la cromatografía electrocinética (EKC) es un modo de separación muy útil para el análisis de las proteínas. En este modo de CE, los analitos se separan en función de su afinidad relativa por una fase pseudo-estacionaria. La fase pseudo-estacionaria más empleada en EKC hasta la fecha son las micelas convencionales de surfactantes, como SDS. Otra opción para la separación electrocinética es el uso de polímeros solubles que migran en contra del flujo electroosmótico (EOF). Así, un ejemplo de estos polímeros son los dendrímeros, macromoléculas con estructuras tridimensionales que han mostrado una enorme aplicabilidad y cuya mayor ventaja se basa en su versatilidad para modificar su esqueleto y superficie. Aunque CE se ha empleado también en el análisis de dendrímeros para caracterizar nuevos dendrímeros o modificaciones de dendrímeros ya existentes y como recubrimiento para algunas columnas de CE para mejorar las eficacias de separación, el empleo de los dendrímeros como fase pseudo-estacionaria en EKC ha sido muy poco estudiado. Algunas de estas aplicaciones están recogidas en dos artículos de revisión (C. P. Palmer, J. P. McCarney, *Electrophoresis* 25 (2004) 4086–4094; M. Castagnola, C. Zuppi, D. V. Rossetti, F. Vincenzoni, A. Lupi, A. Vitali, E. Meucci, I. Messana, *Electrophoresis* 23 (2002) 1769-1778).

20 Es conocido que los dendrímeros pueden interactuar con las proteínas. Estas interacciones dependerán de la estructura del dendrímero, de los grupos existentes en su superficie y del pH del medio. Por ejemplo, existen estudios de la interacción entre dendrímeros carbosilanos, con grupos amonio o amino en la superficie, y una proteína como la albúmina de suero bovino (BSA) empleando *quencher*s fluorescentes, no observando cambios conformacionales en la proteína debido a esta interacción. Los análisis a nivel estructural mostraron que estos dendrímeros se unían a BSA via interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas (E. Pedziwiatr, D. Shcharbin, L. Chonco, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, B. Klajnert, M. Bryszewska, M. A. Muñoz-Fernandez, J. Fluoresc. 19 (2009) 267-275). Realizando el análisis con dendrímeros tipo PAMAM (J. S. Mandeville, H. A. Tajmir-Riahi, *Biomacromolecules* 11 (2010) 465-472), estas interacciones pueden dar lugar a la formación de complejos estables.

25 Por otro lado, se ha descrito el uso de dendrímeros catiónicos y aniónicos Starburst PAMAM de diferentes generaciones para mejorar la separación de proteínas en CE y de esta manera mejorar los perfiles de proteínas de pollo sarcoplásmico (C. Stathakis, E. A. Arriaga, N. J. Dovichi, J. Chromatogr. A 817 (1998) 233–238). Además, existe otro trabajo donde se ha examinado la influencia de dendrímeros catiónicos PAMAM en la separación de patrones de proteínas por CE (Q. Liu, J. Tian, C. Zhang, H. Yang, Y. Liu, W. Qin, Z. Liu, *Electrophoresis* 32 (2011) 1302-1308).

30 Por lo tanto, resulta muy interesante y prometedor el estudio de nuevos dendrímeros solubles en agua para investigar su efecto en la separación de proteínas por EKC y en la mejora de los perfiles proteicos. Estos perfiles constituyen una herramienta de análisis muy útil para la diferenciación y clasificación de diversos alimentos. La utilidad de estos perfiles depende de la reproducibilidad del método electroforético y del número de picos resueltos que se obtienen, ya que esto permite una total comparación de diversos perfiles y asegura la especificidad de los mismos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 En la presente invención se describen dendrímeros carbosilano con un interior constituido por enlaces carbonosilicio y una superficie cargada negativamente, empleando CE y una valoración potenciométrica. Estos dendrímeros se evaluaron como nanoaditivos en EKC para la mejora de los perfiles proteicos. Por tanto, los dendrímeros empleados en la presente invención se proponen como atractivos nanoaditivos para la separación de proteínas vegetales por EKC ya que permiten una clara mejora de los perfiles proteicos.

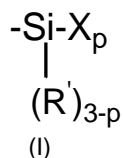
40 La utilización de los dendrímeros utilizados en la presente invención, es decir, de dendrímeros de estructura carbosilano funcionalizados con grupos aniónicos en la superficie es interesante puesto que estos sistemas tienen una superficie hidrofílica debido a las cargas negativas de los grupos terminales (COO^- , SO_3^- o PO_3^{2-}) y que le

confieren solubilidad en agua, pero al mismo tiempo presentan un esqueleto con carácter hidrofóbico. La ambifilia de estos sistemas conduce a interacciones con proteínas más eficientes que las que presentan por ejemplo los dendrímeros aniónicos Starburst PAMAM descritos en el estado de la técnica, ya que estos carecen de ese carácter hidrofóbico.

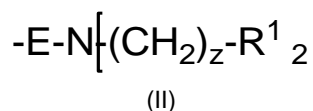
Los perfiles proteicos se han convertido en una herramienta muy importante en la diferenciación y clasificación de variedades de diversos alimentos, así como en la obtención de "huellas dactilares" específicas para ellas. El correcto empleo de estos perfiles proteicos está condicionado a conseguir una buena eficacia de separación para obtener diversos picos y bien resueltos. Así, a modo de ejemplo los dendrímeros carbosilano, con un interior constituido por enlaces carbono-silicio y una superficie cargada negativamente debido a los grupos carboxilato que presenta como grupos funcionales, se emplean con éxito como nanoaditivos para separar las proteínas de soja y de semilla de aceituna. Primero, estos dendrímeros fueron caracterizados empleando CE para determinar sus posibles impurezas de reacción. Por medio de una valoración potenciométrica, se determinaron sus pKa. Posteriormente, estos dendrímeros carbosilano se emplearon para mejorar los perfiles proteicos de distintas proteínas vegetales, obtenidos por EKC. Se probaron distintas generaciones de dendrímero (G0, G1 y G2) así como diferentes concentraciones (0,01-1% m/v). La generación más grande (G2) a una concentración de 0,1% (m/v) permitió observar los mejores perfiles proteicos de soja y semillas de aceituna. Estos resultados demuestran que los dendrímeros carbosilano con grupos aniónicos, en concreto grupos carboxilato, fosfato o sulfato, en la superficie son una atractiva alternativa como nanoaditivos en EKC para la separación efectiva de proteínas vegetales.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un dendrímero carbosilano aniónico que comprende:

- un núcleo polifuncional y
- una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R¹ es un grupo alquilo (C₁-C₄),
p varía entre 1 y 3, y
X es el siguiente grupo de fórmula (II):



donde: E es un grupo enlazante entre el silicio y el grupo amina,
z varía entre 1 y 4,
R¹ se selecciona de un grupo de la lista que comprende -COO⁻, -SO₃⁻ o -PO₃²⁻, o cualquiera de sus sales;

como nanoaditivo en electroforesis capilar para la separación de proteínas.

Mediante referencia se incluye cualquiera de las realizaciones preferidas de los dendrímeros aniónicos, con grupos carboxilato, fosfato o sulfato, descritos en la solicitud internacional WO2011/101520, además de cualquiera de sus sales, preferiblemente las alcalinas o alcalinotérreas, y más preferiblemente las de sodio.

En una realización preferida del uso de la presente invención, el núcleo de los dendrímeros es de silicio o polifenólico según se describe en la solicitud internacional WO2011/101520, más preferiblemente el núcleo es de silicio.

En otra realización preferida, E se selecciona entre un alquilo (C₁-C₁₀) o un grupo -(CH₂)_x-R³, donde R³ es un grupo triazol o fenoxo y x varía entre 1 y 6, según se describe en la solicitud internacional WO2011/101520, más preferiblemente E es un grupo alquilo y aún más preferiblemente es un grupo propilo.

En otra realización preferida, el dendrímero es de generación cero (G0), primera (G1) o segunda (G2) generación, tal y como se describen en la solicitud internacional WO2011/101520, más preferiblemente el dendrímero es de segunda generación.

En otra realización preferida p es 1 y más preferiblemente R' es un grupo metilo.

Otra realización preferida de la presente invención, comprende el uso de un dendrímero donde R¹ es COO⁻ y más preferiblemente z es 2.

En una realización más preferida los dendrímeros, es decir, los nanoaditivos se encuentran a una concentración de entre 0,01 y 0,5 % (m/v) con respecto al tampón, más preferiblemente la concentración es de entre 0,01 y 0,3% y más preferiblemente de aproximadamente 0,1%.

5 La CE es una técnica de separación para diferentes moléculas conocida por cualquier experto en la materia. La separación se lleva a cabo en un capilar. Dentro de este capilar se encuentran la disolución que contiene los analitos o las moléculas a separar, concretamente en la presente invención las proteínas, y el tampón o medio electrolítico que es el encargado de conducir la corriente. La separación se lleva a cabo según la relación masa/carga de las distintas moléculas y para que esto sea posible es necesario aplicar una diferencia de potencial entre los dos
10 extremos del capilar. La eficacia y la velocidad de la separación se pueden mejorar mediante la optimización de diferentes factores como son la temperatura, el voltaje aplicado, el medio de separación, el disolvente en el que se encuentra disuelta la muestra, etc. Generalmente se obtienen tiempos de análisis bastante bajos si se compara con otras técnicas separativas como la cromatografía de gases o la de líquidos. Además el consumo de muestra y reactivos es muchísimo menor por lo que se la puede considerar una técnica más limpia. Se puede acoplar a un
15 detector UV, de fluorescencia, un espectrómetro de masas, etc.

En el caso concreto en el que en la electroforesis capilar los analitos se separan en función de su afinidad relativa por una fase pseudo-estacionaria dicha técnica se denomina cromatografía electrocinética (EKC).

20 En una realización preferida de la presente invención la electroforesis se lleva a cabo con las siguientes condiciones: a un voltaje de entre 15 y 25 kV, a una temperatura de entre 20°C y 30 °C; preferiblemente la muestra se introduce mediante presión (inyección hidrodinámica), más preferiblemente a una presión de aproximadamente 50 mbar, y aún más preferiblemente durante unos 5 a 10 segundos; además preferiblemente se utiliza un capilar de 50-75 µm de diámetro interno y de 50-60 cm de longitud total y con un tampón básico.

25 El tampón básico utilizado en la presente invención es cualquiera a pH superior de 6 y conocido por cualquier experto en la materia, preferiblemente a pH de entre 8 y 9,5, y más preferiblemente se utiliza un tampón borato.

30 Las proteínas a separar en la presente invención podrían ser tanto animales como vegetales, preferiblemente son vegetales.

35 Las proteínas vegetales a analizar pueden provenir de todo tipo de alimentos como por ejemplo cereales, soja, aceitunas, legumbres, frutas, entre otros, o de sus semillas, es decir todo aquel alimento vegetal que puede ser susceptible de adulterar y/o manipular variando sus proteínas y, por tanto, sus propiedades beneficiosas como alimento.

40 Mediante la separación de dichas proteínas se pueden obtener los perfiles proteicos de los alimentos analizados. Por "perfiles proteicos" se refiere en la presente invención a un conjunto de picos registrado tras una separación electroforética y atribuido a unas proteínas que identifican o que son características del alimento a analizar.

45 Por tanto, al realizar una trazabilidad entre los perfiles proteicos de un alimento conocido (o patrón) y otro a analizar se pueden utilizar de manera particular para la caracterización de un alimento.

Entendiéndose por "caracterización de un alimento" a la determinación de la calidad y/o autenticidad del mismo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende un dendrímero carboxilano aniónico o sus sales según se ha descrito anteriormente y un tampón básico como el descrito anteriormente. Preferiblemente el tampón tiene un pH de entre 8 y 9,5, y más preferiblemente es tampón borato.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit para la separación de proteínas mediante CE, más preferiblemente de las proteínas vegetales, más preferiblemente para obtención de perfiles proteicos y aún más preferiblemente para la caracterización de alimentos.

55 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

60 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Estructuras de unos dendrímeros carboxilano de generación cero (G0), primera (G1) y segunda (G2). La fórmula molecular, la masa molecular y la composición se indican debajo de cada estructura.

65 **FIG. 2.** Separación en el modo de CE de los dendrímeros carboxilano de las generaciones 0, 1 y 2 de la FIG. 1 a 0,5 % (m/v) de concentración en tampón borato 100 mM a pH 9,0. Las condiciones electroforéticas fueron: tampón

borato 100 mM (pH 9,0); capilar de 75 μ m de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva (58,5 cm longitud total); inyección por presión, 50 mbar durante 10 s; temperatura del capilar de 20 °C; voltaje, 15 kV; detección UV a 214 nm (5 nm ancho banda).

5 **FIG. 3.** Comparación de los perfiles proteicos obtenidos para las proteínas de la soja sin dendrímero y con diferentes generaciones (G0, G1 y G2) a tres concentraciones (0,01; 0,05 y 0,1 % (m/v)) del dendrímero carbosilano de la FIG 1. Las condiciones de separación como en la FIG 2 a excepción de la inyección por presión, 50 mbar durante 5 s y la detección UV a 254 nm (5 nm ancho de banda).

10 **FIG. 4.** Comparación de los perfiles proteicos obtenidos para las proteínas de la semilla de aceituna sin dendrímero y con diferentes generaciones de dendrímero (G0, G1 y G2) de la FIG. 1 en la misma concentración (0,1 %, m/v). Condiciones de separación como la FIG 3.

EJEMPLOS

15 **Reactivos y materiales**
Acetonitrilo grado HPLC, cloroformo, acetona, tetrahidrofurano (THF), isopropanol, metil etil cetona y ditioneitol (DTT) se obtuvieron de Scharlau Chemie (Barcelona, España). Urea, ácido clorhídrico, ácido bórico, tris (tris(hidroximetil)aminometano), SDS, e hidróxido de sodio se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania), dimetil sulfóxido (DMSO) de Fluka (Buchs, Suiza), y guanidina de Sigma (St. Louis, MO). Todas las disoluciones se prepararon con agua ultrapura de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Los tampones de separación se filtraron antes de su uso por medio de filtros de jeringa de nylon de 0,45 μ m de diámetro de poro de Titan (Titan 2, Eatontown, NJ). El aislado de proteínas de soja (SPI) empleado durante de optimización del método fue obtenido de ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA). Las muestras de aceituna analizadas en este trabajo pertenecían a la variedad Hojiblanca y fueron recogidas en Toledo (España).

20 Dendrímeros carbosilano de generación cero (G0), primera (G1) y segunda (G2) están descritas sus síntesis en WO2011/101520 y fueron empleados sin posterior purificación. En la FIG 1 se pueden observar las estructuras de los diferentes dendrímeros empleados. Como se puede ver, el número de grupos terminales de los dendrímeros y su masa molecular aumenta rápidamente con la generación de dendrímero. Estos dendrímeros tienen 8, 16 y 32 grupos superficiales respectivamente, y una masa molecular comprendida entre 1413,79 y 6593,29 Da. Las disoluciones de dendrímeros fueron preparadas en tampón borato (100 mM, pH 9,0) y con concentraciones comprendidas entre 0,01 y 1 % (m/v).

Preparación de la muestra

35 Las proteínas de la soja fueron extraídas empleando una mezcla agua:ACN (80:20, v/v) con sonicación durante 3 min y centrifugación (Heraeus Instrument, Hanau, Alemania) a 4000g durante 3 min (C. Simó, E. Domínguez-Vega, M. L. Marina, M. C. García, G. Dinelli, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 31 (2010) 1-9).

40 La extracción de las proteínas de las muestras de aceituna se realizó partiendo de semillas de aceitunas de la variedad Hojiblanca y de acuerdo con un método previamente desarrollado por Wang y col. (W. Wang, J. Alché, M. I. Rodríguez-García, *Acta Physiol. Plant* 29 (2007) 439-444), con algunas modificaciones. De manera resumida, se eliminó la pulpa de las aceitunas y se extrajo la semilla del hueso. Las semillas se homogeneizaron empleando un triturador doméstico (Kenwood Ibérica, Barcelona, España). Se extrajeron las proteínas de 500 mg de semillas de aceitunas empleando 5 mL de un tampón 125 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 % (m/v) SDS y 0,5 % (m/v) DTT (C. Esteve, C. del Río, M. L. Marina, M. C. García, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8176-82), y agitando vigorosamente durante 2 min. Se realizó una centrifugación a 4000g durante 15 min, repitiendo este paso tres veces. Después de la centrifugación, se añadieron 5 mL de cloroformo y se separaron dos fases por centrifugación a 4000g durante 15 min. Las proteínas retenidas en la fase orgánica fueron precipitadas con 2 volúmenes de acetona a -20 °C durante 30 min. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 4000g durante 15 min, y se lavaron con 90 % (v/v) de acetona. Se solubilizaron en 0,5 mL de tampón borato 100 mM (pH 9,0) y se filtraron con filtros de 0,45 μ m antes de su inyección en el sistema de CE.

Electroforesis Capilar

55 Se empleó un equipo HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con un *on-column* DAD para detección UV y colector de espectros. Todos los experimentos se realizaron en capilares de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de 75 μ m de diámetro interno y longitud efectiva de 50 cm (58,5 cm de longitud total). Se realizó un acondicionamiento entre inyecciones de la muestra con 0,1 M hidróxido sódico (1 bar) durante 4 min, agua Milli-Q (1 bar) durante 4 min y tampón de separación (1 bar) durante 5 min. Cuando se emplearon los dendrímeros carbosilano en el tampón, el acondicionamiento fue: 1 M hidróxido sódico (1 bar) durante 4 min, agua Milli-Q (1 bar) durante 4 min y tampón de separación (1 bar) durante 4 min. Las condiciones de separación empleadas: temperatura del capilar 20 °C, voltaje 15 kV y detección UV a 254 nm con un ancho de banda de 5 nm. La inyección de la muestra se realizó por presión, 50 mbar durante 5 s para las proteínas del aislado de la soja y 50 mbar durante 10 s para las proteínas de la semilla de aceituna. Se empleó un tampón borato 100 mM (pH 9,0) con y sin dendrímeros carbosilano para la separación.

Valoración potenciométrica

La valoración de los dendrímeros carbosilano se realizó empleando una valoración potenciométrica ácido-base con un pHmetro Dismadel (Madrid, España). Como valorante se prepararon diferentes disoluciones de HCl 0,0105 y 0,0102 M, previamente valorado en triplicado con 1mM Na₂CO₃.

Resultados y discusión

Caracterización de dendrímeros carbosilano por CE

Se prepararon las disoluciones de dendrímero disolviéndolos en el tampón de separación (tampón borato 100 mM pH 9,0) a una concentración de 0,5 % (m/v). Cada generación de dendrímero fue inyectada a 50 mbar durante 10 s, empleando las mismas condiciones electroforéticas descritas en la sección 2.3, excepto la longitud de onda fijada en este caso a 214 nm. La FIG 2 muestra la separación a pH 9,0 de los dendrímeros carbosilano de generaciones 0, 1 y 2 a 0,5 % (m/v). Los dendrímeros pueden dar lugar a estructuras imperfectas dependiendo de la pureza del monómero y de la eficacia de la reacción, así como de su síntesis, particularmente en protocolos divergentes, resultando en estructuras imperfectas o impuras. Como muestra la FIG 2, todos los electroforegramas mostraban un pico inicial al minuto 5, el cual corresponde con el flujo electroosmótico. G0 muestra otros cinco picos, G1 solo otro y G2 muestra un pico con un hombro no resuelto. Los resultados obtenidos concuerdan con el hecho de que la separación de las impurezas resulta más difícil con el aumento de la generación.

Comportamiento ácido-base de los dendrímeros carbosilano

Se realizó una valoración ácido-base por potenciometría empleando las tres generaciones de dendrímero carbosilano estudiadas en este trabajo. En las curvas de valoración obtenidas se podían observar dos puntos de equivalencia para las tres generaciones. La primera derivada permitió la determinación del valor exacto de esos dos puntos de equivalencia. El primer punto corresponde a la protonación del grupo amino y el segundo corresponde a la protonación del grupo carboxilato (ver FIG. 1 para datos estructurales de cada dendrímero).

El pKa se calculó empleando la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Los resultados para los procesos de protonación del nitrógeno del grupo amino y del grupo carboxilato se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1.

Gn-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]_x						
<i>Grupo amino</i>			<i>Grupo carboxilato</i>			
	pKa	Ka		pKa	Ka	
G0	10,4	10 ^{-10,4}	↓	G0	5	10 ⁻⁵
G1	10,7	10 ^{-10,7}		G1	5,64	10 ^{-5,6}
G2	11,2	10 ^{-11,2}		G2	6,6	10 ^{-6,6}

↓ Basicidad

↑ Acidez

En Gn-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]_x n es el número de generación y x es en número de grupos terminales dependiendo de la generación.

Como se puede observar, existe un efecto dendrítico en la basicidad del grupo amino debido al hecho de que la basicidad de este grupo aumenta con el aumento de la generación de dendrímero. Para el grupo carboxilato, la acidez de este grupo también aumenta con la generación de dendrímero. La estimación del pKa de cada dendrímero permite definir su comportamiento en función del pH y conocer las especies existentes a pH fisiológico para otras aplicaciones.

Efecto de los dendrímeros carbosilano en la separación de las proteínas de la soja

Se seleccionó un aislado de proteína de soja como proteína vegetal de referencia para la optimización de la separación electroforética debido a que contiene un 89,1% (m/m) (determinado por el método Kjeldahl) de proteínas (C. García-Ruiz, M. C. García, A. Cifuentes, M. L. Marina, Electrophoresis 28 (2007) 2314–2323) y a que no existen patrones de proteínas para las aceitunas. Primero se estudió el perfil proteico para las proteínas de la soja sin la adición de dendrímero empleando condiciones de separación básicas, previamente utilizadas para estas proteínas. En nuestro caso, estas condiciones experimentales fueron: capilar de 75 µm de diámetro interno y 50 cm de longitud efectiva (58,5 cm de longitud total); inyección por presión, 50 mbar durante 5 s; temperatura del capilar, 20 °C; voltaje, 15 kV; detección UV a 254 nm (5 nm de ancho de banda) y tampón de separación borato 100 mM a pH 9,0. La concentración de la muestra fue de 50 mg/mL. En estas condiciones, el electroforegrama obtenido mostraba un solo pico ancho (resultados no mostrados). Se probaron diferentes concentraciones de la muestra: 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL y 10 mg/mL, eligiendo 50 mg/mL ya que se obtenía la mejor intensidad de señal. Para intentar mejorar la separación proteica, se optimizaron algunas condiciones electroforéticas antes de emplear los dendrímeros carbosilano. Así, se probaron diferentes pH y diferentes tampones de separación. Se probaron: tampón

borato 100 mM a pH 9,0; el mismo tampón pero con un 20 % (v/v) de ACN o un 1 % (m/v) de SDS, tampón fosfato 50 mM a pH 7,0 y un tampón orgánico (CHES-Tris, 100 mM, pH 9,0). La mejor señal se obtuvo para el tampón borato 100 mM a pH 9,0. Estos experimentos no permitieron aun así mejorar la separación de las proteínas. Por esta razón, se realizó la adición de dendrímeros carboxilano al tampón de separación a modo de intentar mejorar la separación.

Los dendrímeros de la FIG 1 satisfacen las condiciones para ser una buena fase pseudo-estacionaria debido a que son estables y solubles en un amplio rango de condiciones analíticas y a que están disponibles en diferentes estructuras químicas, lo que puede generar diferente selectividad cromatográfica. Se llevó a cabo un *screening* inicial de diferentes generaciones de dendrímero de la FIG. 1 (G0, G1 y G2). Se estudiaron diferentes concentraciones añadiendo 0,01, 0,05 o 0,1 % (m/v) de cada generación de dendrímero al tampón borato. La comparación de los resultados obtenidos cuando se emplearon las tres generaciones de dendrímero a diferentes concentraciones (ver FIG. 3) permitió observar que el número de picos aumentaba con la presencia de los dendrímeros y que aumentaba con la concentración añadida al tampón de separación. G2 al 0,1 % (m/v) de concentración fue la generación de dendrímero que pareció dar la mayor resolución de picos al observar los perfiles electroforéticos obtenidos. Esto concuerda con el hecho de que el número de grupos carboxilato varía en relación a la generación de dendrímero. Así, G2 es la generación que presenta el mayor número de grupos funcionales en la superficie y, por tanto, el mayor número de cargas (32 grupos en la periferia), implicando la posibilidad de un mayor número de interacciones con las cargas positivas de las proteínas de la soja.

La generación G2 se seleccionó como el mejor nanoaditivo para la separación de las proteínas de la soja. Para esta generación se probaron concentraciones mayores de dendrímero en el tampón de separación, 0,5 y 1 % (m/v) para estudiar el efecto de un aumento de la concentración de G2 en la separación. Sin embargo, esta separación no mejoró con concentraciones mayores de 0,1 % (m/v), eliminándose los picos con la concentración más alta, probablemente debido a un aumento de la interacción dendrímero-proteína.

Se obtuvieron tiempos de análisis menores a 25 min en todos los casos. Se resolvieron cinco picos de los dos iniciales en 25 minutos en presencia de 0,1 % de G2 del dendrímero carboxilano con grupos carboxilato en la superficie.

Aplicación de los dendrímeros carboxilano a la separación de las proteínas de la semilla de aceituna

Se empleó, en un principio, un método desarrollado para la extracción de las proteínas del hueso de aceituna (C. Esteve, C. del Río, M. L. Marina, M. C. García, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 8176-82.). El método de extracción consistía en un tampón Tris-HCl con 1% (m/v) de SDS y 0,5% (m/v) de DTT, un paso de centrifugación para eliminar los sólidos que quedaban y un paso de precipitación de las proteínas con acetona. Sin embargo, se modificó este procedimiento de extracción ya que SDS interfiere en la interacción dendrímero-proteína. Por esta razón, se incluyó un paso de separación propuesto por Wang y col. (W. Wang, J. Alché, M. I. Rodríguez-García, Acta Physiol. Plant 29 (2007) 439-444) consistente en la adición de cloroformo después de la extracción con el tampón Tris-HCl. Este paso retenía las proteínas en la fase orgánica, eliminando los interferentes de SDS y algunos compuestos solubles en agua. Se añadió además un paso de lavado con 90% (v/v) de acetona después de la precipitación de las proteínas con acetona. La solubilización de las proteínas fue otro paso crítico en el procedimiento de extracción debido a que las proteínas de membrana (las mayoritarias en el caso de las proteínas de la semilla de aceituna) no se disuelven fácilmente en disolventes acuosos pero sí en presencia de surfactantes o aditivos como urea y guanidina. Sin embargo, SDS, el surfactante universal para la solubilización de las proteínas, interfiere con el complejo dendrímero-proteína. De este modo, se emplearon las proteínas de soja para demostrar este hecho. Las proteínas de la soja extraídas se disolvieron en 0,5 mL de 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) con 1 % (m/v) de SDS. Se observó que SDS impedía la interacción entre los dendrímeros y las proteínas, no permitiendo la separación de las proteínas de soja como ocurría en el caso anterior en el que se empleaba ACN:agua (80:20, v/v) para solubilizar. Por tanto, se probaron otros aditivos normalmente empleados en la solubilización de las proteínas como 6 M de guanidina y 8 M de urea (en 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), obteniendo resultados similares a los obtenidos con SDS. Debido a esta incompatibilidad con los diferentes aditivos empleados, se probaron diversas mezclas de disolventes orgánicos como medio de solubilización para las proteínas extraídas de la semilla de aceituna: 40 % (v/v) de ACN, 20 % (v/v) de metil etil cetona, 50 % (v/v) de DMSO, 50 % (v/v) de THF, 50 % (v/v) de isopropanol y 100 % (v/v) de cloroformo. Ninguno de estos medios permitió la completa solubilización de las proteínas. Como consecuencia, se utilizó el mismo tampón de separación para redissolver las proteínas, a pesar de no permitir la completa redisolución de estas proteínas. La FIG 4 muestra el perfil proteico obtenido para las proteínas de la semilla de aceituna empleando tampón borato (100 mM, pH 9,0) como medio de solubilización. En esta figura se muestra también una comparación de la separación resultante al añadir cada una de las tres generaciones de dendrímeros al tampón de separación. Por la experiencia anterior con las proteínas de la soja, solo se utilizó la concentración mayor (0,1 % (m/v)) para cada generación. Se puede observar que otra vez G2 al 0,1 % (m/v) permitía mejorar el perfil proteico de las proteínas de aceituna ya que se obtuvo un mayor número de picos con la mayores eficacias de separación. De los dos picos iniciales sin dendrímero, se obtuvieron seis picos (cinco bien resueltos) cuando se empleó G2 en el tampón de separación.

Estos resultados muestran que los dendrímeros carboxilano con grupos aniónicos terminales pueden constituir una herramienta analítica muy útil para mejorar los perfiles proteicos con el fin de caracterizar muestras de alimentos vegetales, ya que la naturaleza hidrofóbica del interior de estos dendrímeros puede maximizar la interacción de estos sistemas con las proteínas analizar y de esta forma mejorar su separación mediante CE.

5

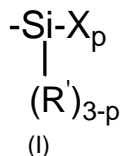
Conclusiones

Los nuevos dendrímeros carboxilano con grupos carboxilato en la superficie se han caracterizado por CE y valoración potenciométrica. Además, estos dendrímeros han permitido mejorar la separación de diferentes proteínas vegetales como las proteínas de soja y de semilla de aceituna al emplearse como nanoaditivos en el tampón electroforético. Para las proteínas de la semilla de aceituna, de los dos picos iniciales observados se consiguieron resolver seis picos (cinco bien resueltos) con la generación G2 a una concentración de 0,1 % (m/v). Este hecho demuestra la utilidad de estos dendrímeros para mejorar la separación electroforéticas.

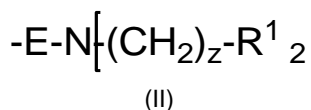
10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un dendrímero carbosilano aniónico que comprende:
- un núcleo polifuncional y
 - una capa externa, que consiste, total o parcialmente, en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R¹ es un grupo alquilo (C₁-C₄),
p varía entre 1 y 3, y
X es el siguiente grupo de fórmula (II):



donde: E es un grupo enlazante entre el silicio y el grupo amina,
z varía entre 1 y 4,
R¹ se selecciona de un grupo de la lista que comprende -COO⁻, -SO₃⁻ o -PO₃²⁻, o
cualquiera de sus sales;

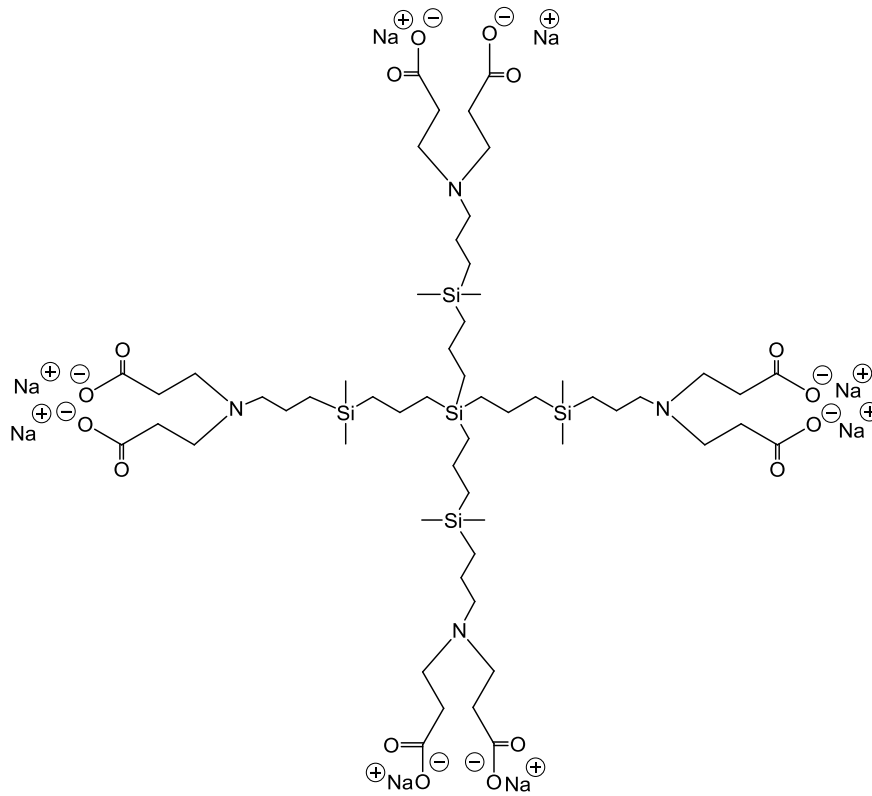
como nanoaditivo en electroforesis capilar para la separación de proteínas.

2. Uso según la reivindicación 1, donde el núcleo es de silicio.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde p es 1.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R¹ es metilo.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde E se selecciona entre un alquilo (C₁-C₁₀) o un grupo -(CH₂)_x-R³, donde R³ es un grupo triazol o fenoxo y x varía entre 1 y 6.
6. Uso según la reivindicación anterior, donde E es propilo.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el dendrímero es de generación cero, uno o dos.
8. Uso según la reivindicación anterior, donde el dendrímero es de segunda generación.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R¹ es -COO⁻.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde z es 2.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde las sales son alcalinas o alcalinotérreas.
12. Uso según la reivindicación anterior donde las sales son de sodio.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el dendrímero tiene una concentración de entre 0,01 y 0,5 % (m/v).
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las proteínas son vegetales.
15. Uso según la reivindicación anterior, donde las proteínas son de soja o de aceituna.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la obtención de perfiles proteicos.
17. Uso según la reivindicación anterior, para la caracterización de un alimento.
18. Kit que comprende un dendrímero carbosilano aniónico según se describe en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un tampón básico.
19. Kit según la reivindicación anterior, donde el tampón es de pH de entre 8 y 9,5.
20. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, donde el tampón es tampón borato.

ES 2 417 254 A1

21. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde el dendrímero tiene una concentración de entre 0,01 y 0,5 % (m/v) con respecto al tampón.
- 5 22. Uso del kit descrito en las reivindicaciones 18 a 21, para la separación de proteínas.
23. Uso del kit según la reivindicación anterior para la separación de proteínas vegetales.
24. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23, para la obtención de perfiles proteicos.
- 10 25. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, para la caracterización de un alimento.

G0



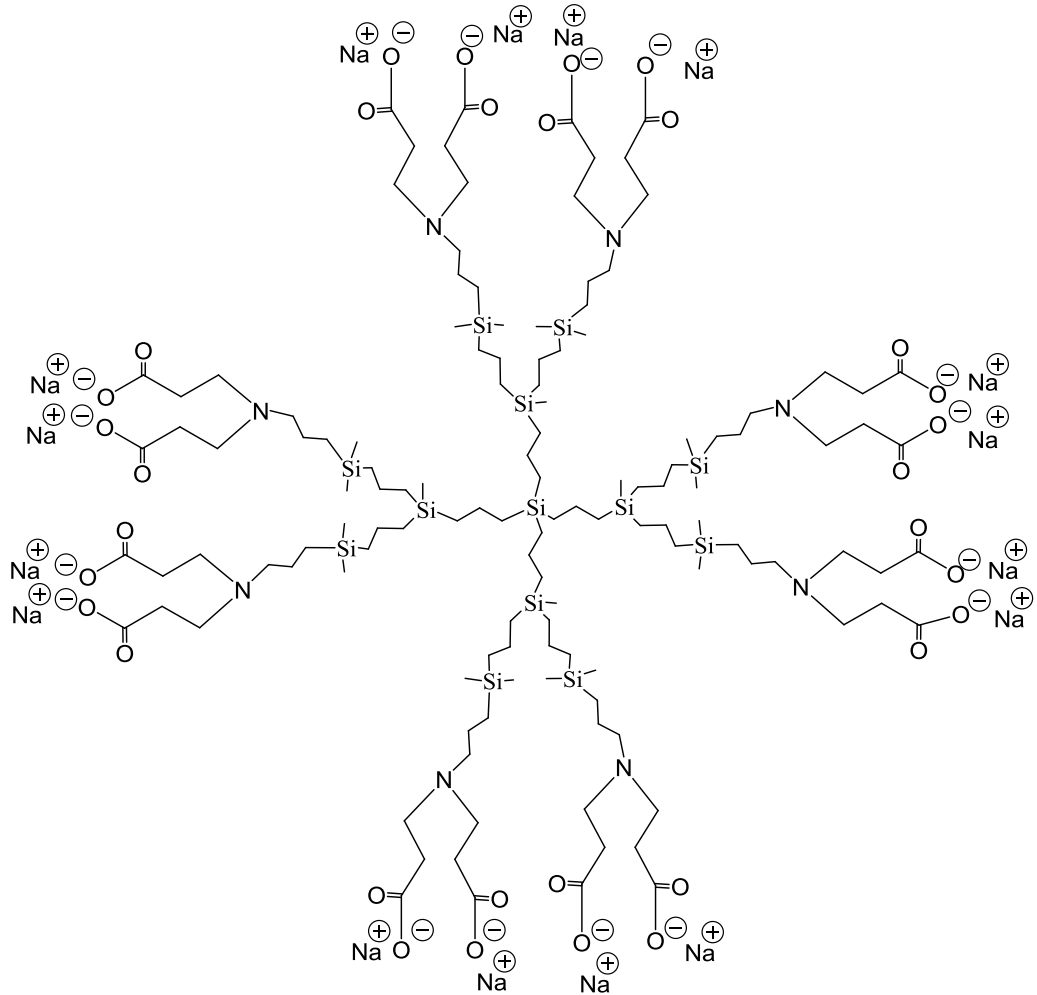
Masa exacta: 1412,55

Masa molecular: 1413,79

C, 47,57; H, 7,41; N, 3,96; Na, 13,01; O, 18,11; Si, 9,93

FIG. 1 (CONT.)

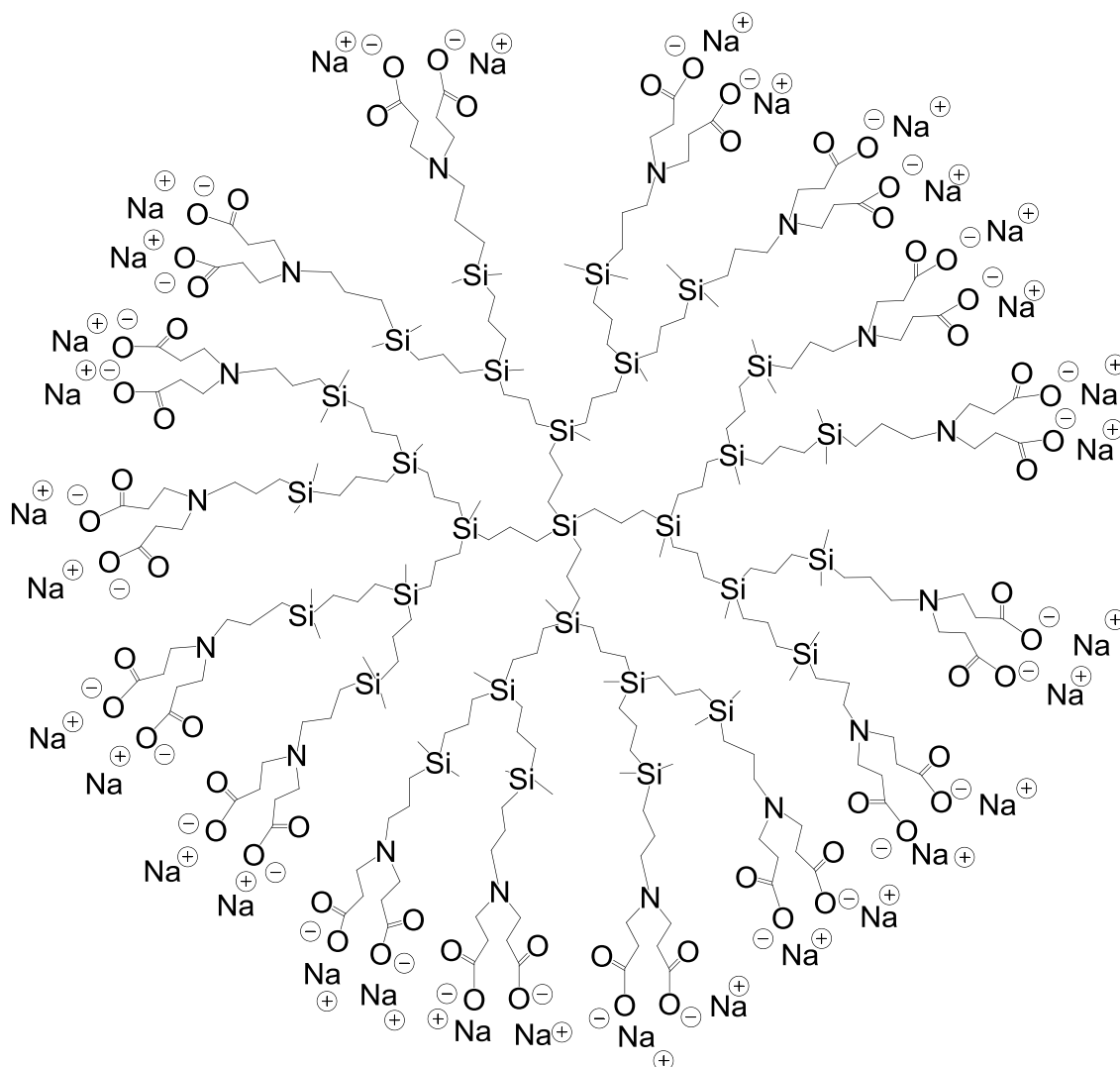
G1



$C_{128}H_{244}N_8Na_{16}O_{32}Si_{13}$
 Masa exacta: 3137,31
 Masa molecular: 3140,29
 C, 48,96; H, 7,83; N, 3,57; Na, 11,71; O, 16,30; Si, 11,63

FIG. 1 (CONT.)

G2


$$C_{272}H_{524}N_{16}Na_{32}O_{64}Si_{29}$$

Masa exacta: 6586,83

Masa molecular: 6593,29

C, 49,55; H, 8,01; N, 3,40; Na, 11,16; O, 15,53; Si, 12,35

FIG. 1

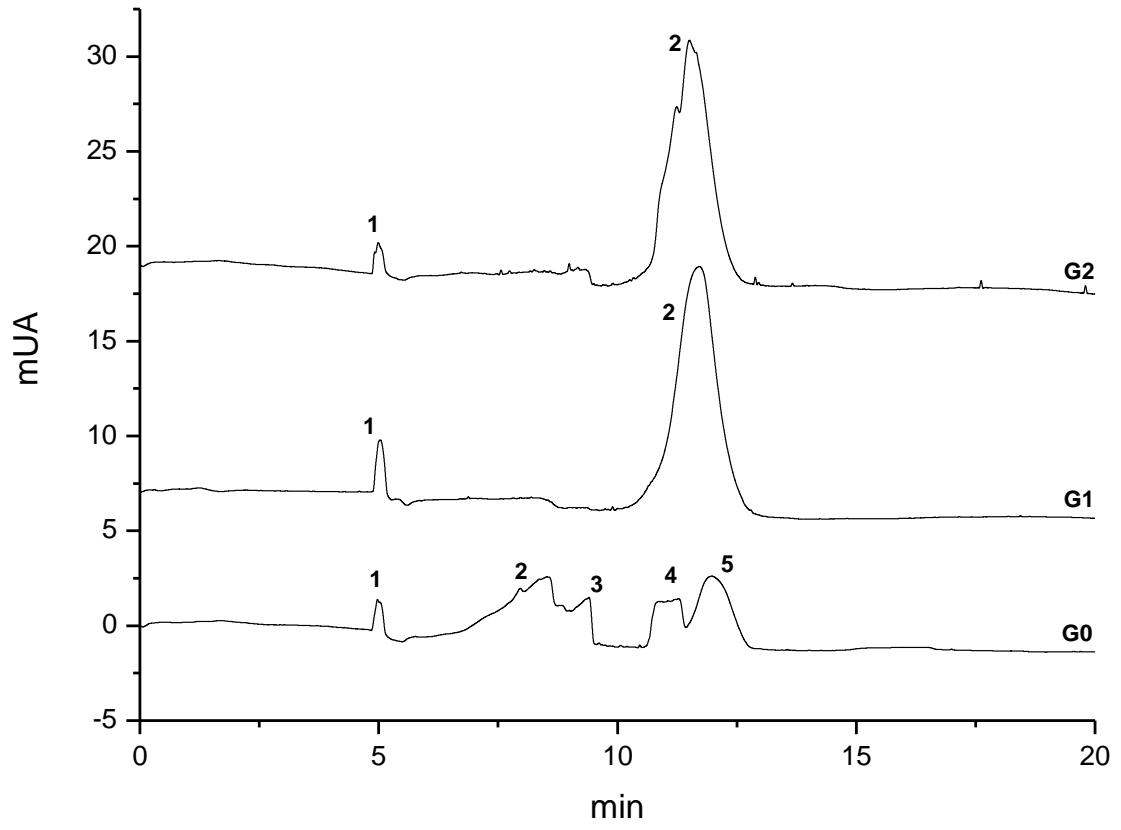


FIG. 2

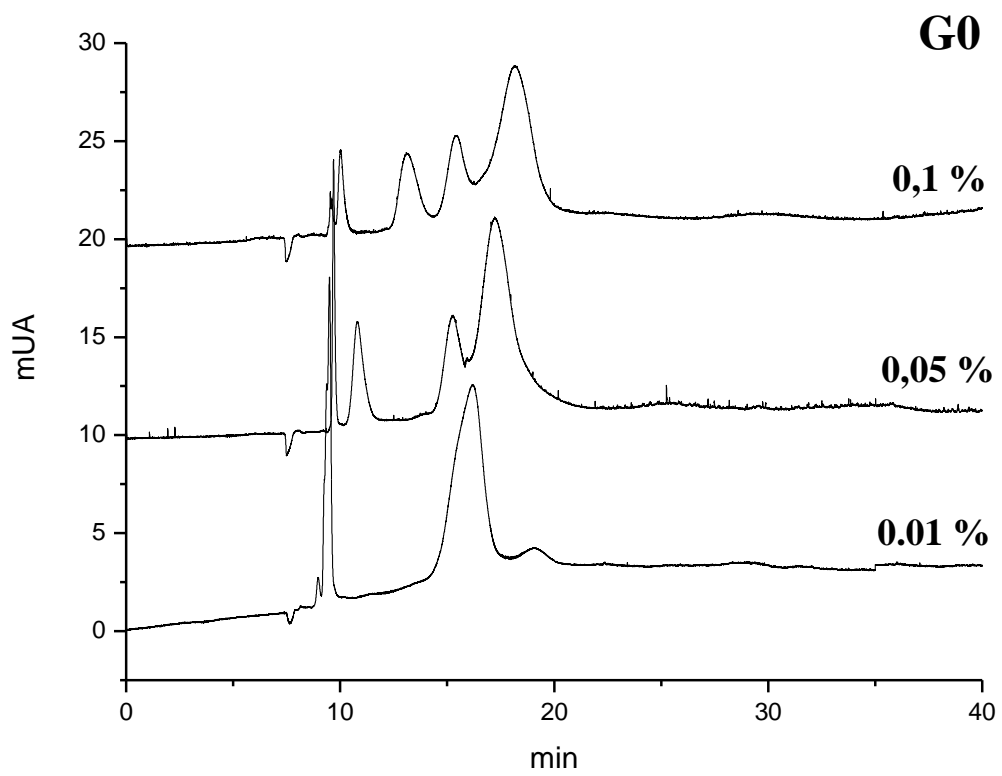
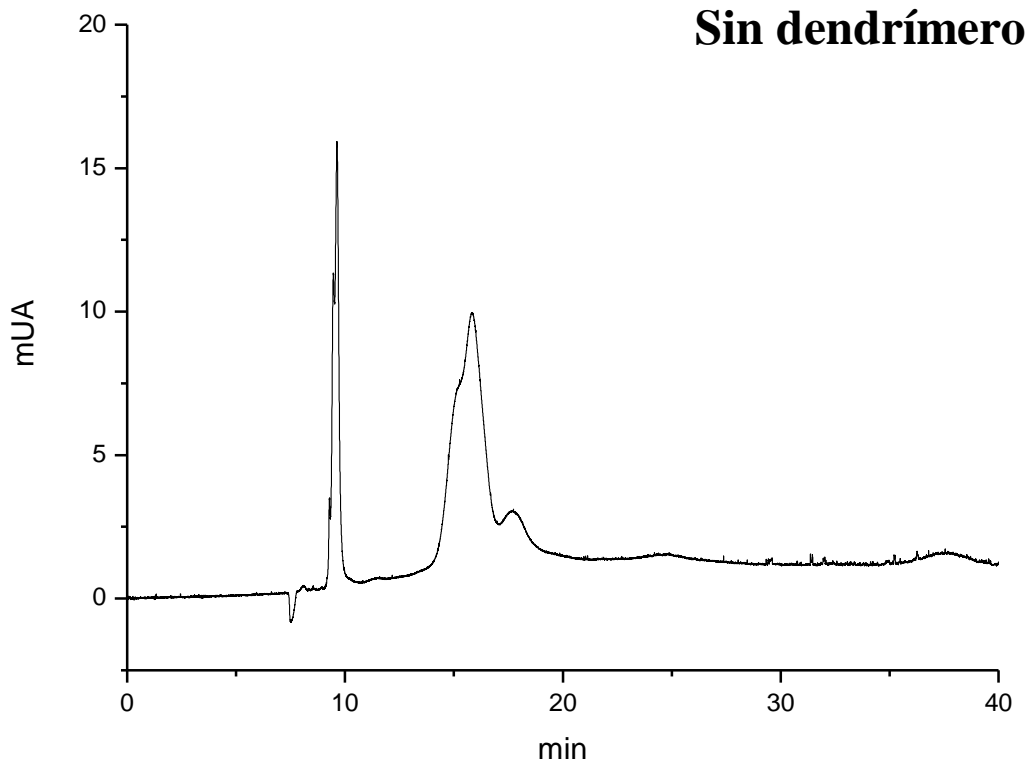


FIG. 3 (CONT.)

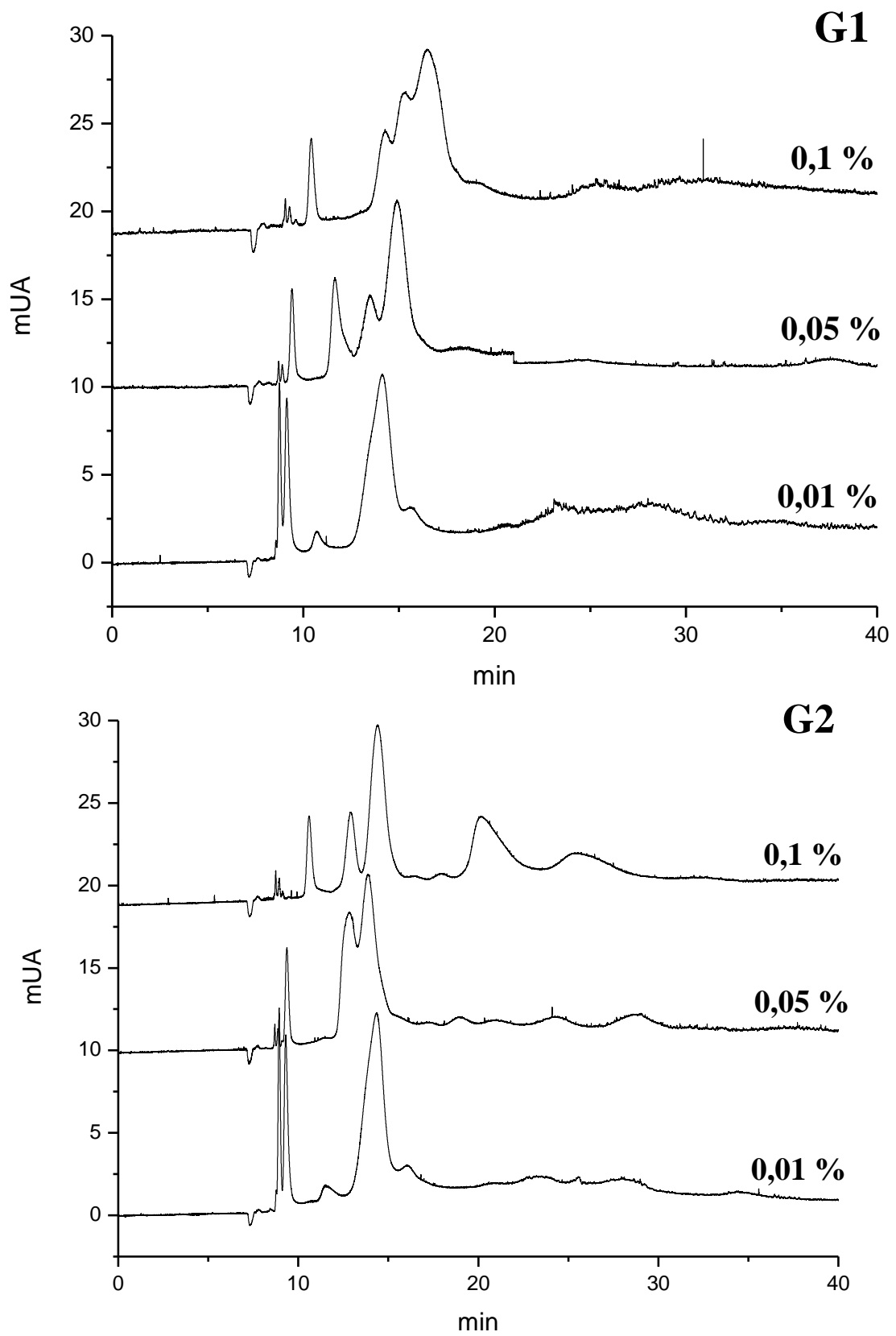


FIG. 3

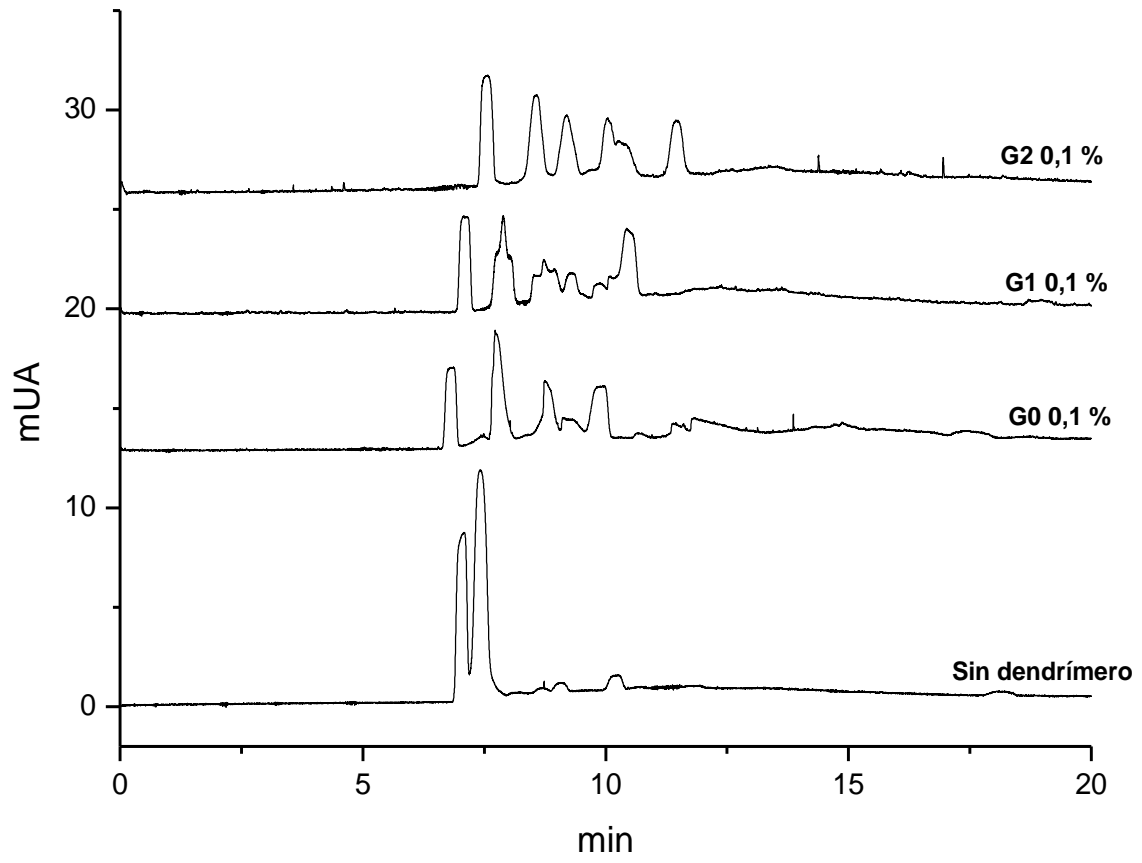


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230148

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2011101520 A2 (UNIVERSIDAD DE ALCALA y HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑON) 25.08.2011, reivindicaciones; ejemplos.	1-13
A	C GARCÍA-RUIZ et al., ELECTROPHORESIS 2007, vol 28, nº 13, págs 2314-2323. "Characterization and differentiation of diverse transgenic and non transgenic soybean varieties from CE protein profiles"	14-25
A	C SIMÓ et al., ELECTROPHORESIS 2010, vol 31, nº 7, págs 1175-1183. "CE-TOF MS analysis of complex protein hydrolyzates from genetically modified soybeans. A tool for foodomics"	14-25

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
14.11.2012

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G83/00 (2006.01)

C07F7/08 (2006.01)

G01N33/02 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08G, C07F, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, ESPACENET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2011101520 A2 (UNIVERSIDAD DE ALCALA y HOSPITAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑON)	25.08.2011
D02	C GARCÍA-RUIZ et al., ELECTROPHORESIS 2007, vol 28, nº 13, págs 2314-2323. "Characterization and differentiation of diverse transgenic and non transgenic soybean varieties from CE protein profiles"	2007
D03	C SIMÓ et al., ELECTROPHORESIS 2010, vol 31, nº 7, págs 1175-1183. "CE-TOF MS analysis of complex protein hydrolyzates from genetically modified soybeans. A tool for foodomics"	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere (reivindicaciones 1-13) al uso de los dendrímeros carbosilanos aniónicos de fórmula (I) de la reivindicación 1 para la separación de proteínas, en concreto proteínas vegetales (reivindicaciones 14-17), por electroforesis capilar (CE) y al kit para la separación de proteínas vegetales que comprende un dendrímero carbosilano aniónico de fórmula (I) y su uso para la obtención de perfiles proteicos en las reivindicaciones 18-25.

El documento D1 divulga dendrímeros carbosilano del tipo de los de fórmula (I) de la solicitud, no se menciona su posible uso en electroforesis capilar para separar y caracterizar proteínas.

Los documentos D2 y D3 divulgan la utilización de electroforesis capilar para caracterizar el perfil proteico de variedades de soja, en ambos casos las fases utilizadas no sugieren el uso de dendrímeros carbosilanos como nanoaditivos para mejorar la eficiencia del método.

En consecuencia se considera que las reivindicaciones 1-25 de la solicitud cumplen los requerimientos de novedad y actividad inventiva según los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.