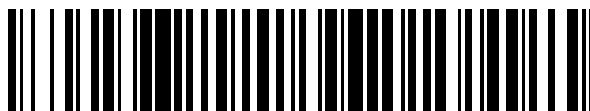


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 509**

51 Int. Cl.:

C07D 407/12 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C07D 311/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2001 E 01940647 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1285086**

54 Título: **Método de liberación de un producto que comprende una oxidación química, detección del producto y aplicaciones adicionales**

30 Prioridad:

30.05.2000 FR 0006952

20.10.2000 FR 0013487

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.11.2013

73 Titular/es:

PROTEUS (50.0%)

Parc Georges Besse 70, Allée Graham Bell

30000 Nîmes, FR y

UNIVERSITE DE BERNE (50.0%)

72 Inventor/es:

REYMOND, JEAN-LOUIS;

WAHLER, DENIS;

BADALASSI, FABRIZIO y

NGUYEN, HONG-KHANH

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 429 509 T3

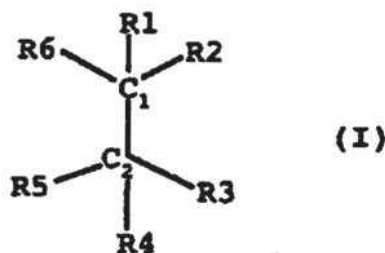
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

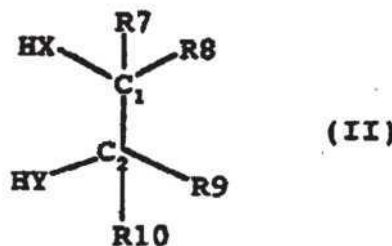
Método de liberación de un producto que comprende una oxidación química, detección del producto y aplicaciones adicionales.

La presente invención tiene por objeto un método de detección de la transformación química y/o enzimática de un sustrato en un compuesto detectable, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:

a) la transformación química de un sustrato de fórmula (I) en la que el enlace C₁-C₂ es insensible a una ruptura por una reacción de oxidación química:



en un compuesto de fórmula (II) en la que el enlace C₁-C₂ es sensible a una ruptura por una reacción de oxidación química efectuada por medio de un agente químico oxidante:



y,
(b) la oxidación química del compuesto de fórmula (II) obtenido en la etapa (a) que rompe el enlace C₁-C₂ para obtener directamente o indirectamente un producto detectable,

y en que en los compuestos de fórmulas (I) y (II):

- al menos uno de los grupos R₁ a R₆ es un grupo Di que es insensible a la reacción de oxidación de la etapa (b) y que presenta propiedades detectables después de la ruptura del enlace C₁-C₂,
- los grupos R₁ a R₆, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, un grupo funcional sustituido o no y, en el caso de un grupo funcional de fórmulas -OR₁₂, -SR₁₂ o -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,
- el o los grupos R₁ a R₆ que forman después de la etapa (a) los grupos de fórmulas -XH y -YH son insensibles a la oxidación de la etapa (b),
- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,
- R₇ a R₁₀, idénticos o diferentes, o bien idénticos a cuatro como máximo de los grupos R₁ a R₆, o bien, debido a la transformación de uno o varios de los grupos R₁ a R₆, durante la reacción de la etapa (a), se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no, y al menos uno de los grupos R₇ a R₁₀ es un grupo Di.

Chang et al. (1990, Biochem J, 272, 683-690) describen la oxidación del cis-diol de la ribosa presente en el 1, monofosfato de N⁶-etenoadenosina (εAMP) por el peryodato para conducir al derivado dialdehído (εAMP-dial), que es un inhibidor de la fosfatasa alcalina de la placenta humana utilizado como marcador de afinidad.

Hanessian et al. (1977, Can. J Chem, 56(11), 1482-1491) describen la preparación de antibióticos aminoglicosídicos a partir de sustancias emparentadas cuyos dioles vecinales han sufrido una oxidación por el peryodato seguida de una β-eliminación.

EP0796854 describe un compuesto derivado del benzopirano y su utilización para tratar enfermedades cardiacas. Entre estos derivados del benzopirano se encuentran los compuestos 3-etoxi-4-hidroxi-7-(3,4-dihidroxibutoxi)-2H-1-benzopiranon-2-ona, 3-butoxi-4-hidroxi-7-(3,4-dihidroxibutoxi)-2H-1-benzopiranon-2-ona, 3-hexioxi-4-hidroxi-7-(3,4-dihidroxibutoxi)-2H-1-benzopiranon-2-ona y 3-octioxi-4-hidroxi-7-(3,4-dihidroxibutoxi)-2H-1-benzopiranon-2-ona, que son todos dioles.

Laptip et al. (1999, *Phytochemistry*, 51(1), 107-110) describen un compuesto (éster metílico de 7-(3-metil-4-carboxibutanoxi)umbeliferona), que es un derivado de la cumarina.

Matsumoto et al. (1994, *Chem Pharm Bull*, 42(6), 1191-1197) describen una reacción de hidrólisis de derivados 1-acetoxi-2-ariopropanos racémicos por medio de una lipasa.

Reetz et al. (1998, *Angewandte Chemie*, 37(4), 481-483) describen un sistema catalítico para la reacción de Heck de halogenuros de alquilo no reactivos, así como el compuesto 2-etileno-6-metoxinaftaleno.

Jourdain et al. (1998, *Tetrahedron Letters*, 39, 9415-9418) describen un test fluorogénico para la determinación de actividades aldolasas estereoselectivas que utilizan un anticuerpo catalítico antialdolasa para bloquear selectivamente la actividad diastereoselectiva de las aldolasas.

Klein y Reymond (1999, *Helvetica Chimica Acta*, 82, 400-407) describen un método de detección de esterasas o de lipasa por medio de un sustrato para obtener alcoholes, los cuales se transforman por una enzima alcohol deshidrogenada para obtener la umbeliferona.

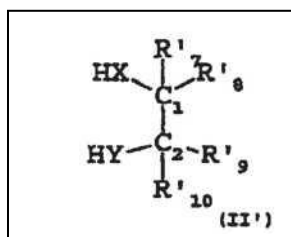
Klein y Reymond (1998, *Biorg Med Chem Lett*, 8, 1113-1116) describen un método fluorométrico enantioselectivo para la detección de alcohol deshidrogenasas.

EP0317243 describe un método de determinación de la actividad de enzimas que permite a un sustrato formar una pigmentación detectable.

Roeschlaubet al (1999, *Chem Communications*, 1637-1638) describen una sonda fluorescente para la detección de NAD(P)H.

List et al. (1998, *Proceedings of the Nat Ac of the Sc of the US*, 95(26), 15351-15355) describen sustratos fluorogénicos a base de aldol para la detección de anticuerpos con una actividad antialdolasa.

También se describe en la presente invención un método para la liberación de al menos un producto para ser detectado, caracterizado porque se somete al compuesto de la fórmula (II') a:



- a una oxidación química que rompe el enlace C1-C2 para obtener el mencionado producto, en el mencionado compuesto de fórmula (II'):

- R'7 a R'10, idénticos o diferentes, corresponden a un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, un grupo funcional sustituido o no.

- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR₁₁R₁₂; R₁₁ se elige entre: un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno.

Según la invención, la reacción de oxidación química se realiza por medio de un agente químico oxidante que puede corresponder de manera ventajosa y de manera no limitativa a uno o varios de los reactivos siguientes H₅IO₆, RuO₂, OsO₄, (CH₃CH₂CH₂)₄N(RuO₄), NaClO₄, NaIO₄, Na₃H₂IO₆, NaMnO₄, K₂OsO₄, KIO₄, KMnO₄, KRuO₄, K₂RuO₄, LiOCl, el acetato de plomo, el peryodato de tetrapropilamonio, el ácido crómico o sus sales, NaBiO₃, Ph₃BiCO₃, Ca(OCI)₂, los reactivos Ce(IV), Cr(VI), las sales de Co (II), IOAc, I(OAc)₃, N-yodosuccinimida, VO(acac), Pb(OAc)₄, MnO₂, H₂O₂ o la mezcla de los reactivos [H₂O₂, Na₂WO₄, H₃PO₄].

De manera preferente, el agente químico oxidante es una sal de peryodato.

El mencionado producto, liberado directamente o indirectamente, puede ser una molécula volátil o una sustancia activa capaz de modular una función como, en especial, una sustancia farmacológica o también un compuesto detectable.

En la presente invención, se entiende por:

- Molécula volátil: una o varias moléculas solas o en combinación que tienen la propiedad de ser volátiles, en especial toda molécula de tipo aldehído o cetona volátil como, por ejemplo, numerosos perfumes o numerosas moléculas bioactivas como las feromonas.
- Sustancia activa: una o varias moléculas solas o en combinación capaces de modular una función como, en especial, una sustancia farmacéutica capaz, por ejemplo, de modular una acción hormonal, una acción fisiológica (presión sanguínea, humor, estado de vigilia) o un desarrollo maligno (tumor). Las sustancias activas también pueden corresponder a moléculas que tienen propiedades curativas o preventivas de una enfermedad. Las sustancias activas también pueden tener un efecto antibiótico o insecticida o presentar propiedades específicas de olor o sabor.
- Compuesto específico: uno o varios compuestos susceptibles de presentar, solos o en combinación, una variación de sus propiedades biofísicas, biológicas o químicas antes y después de la etapa de oxidación química, como, en especial, una variación de tipo espectral o una variación de la solubilidad.
- Oxidación química: cualquier reacción química realizada en presencia de un reactivo químico susceptible de oxidar el producto de fórmula (II') y que induce una ruptura del enlace entre los carbonos C1 y C2.
- Grupo funcional: cualquier grupo químico perteneciente a una clase de compuestos orgánicos caracterizado por propiedades químicas. Se pueden citar como ejemplo de grupo funcional: amidas, acilos, alcoxi, nitrilos, arilos, heteroarilos, alquénilos, carbonilos, tiocarbonilos, carboxilos, tiocarboxilos, carbamilos, tiocarbamilos, tiocarbamidas, alcoholes, tioles, aminas sustituidas o no.
- Liberación directa: la liberación del producto obtenida directamente después de la mencionada reacción de oxidación química.
- Liberación indirecta: la liberación del producto obtenida después de una o varias reacciones secundarias, en especial química, tras la mencionada reacción de oxidación química. La reacción secundaria puede corresponder, a modo de ejemplo, a una reacción de beta eliminación. También son liberaciones indirectas las que resultan de la exposición de un producto obtenido directamente después de la mencionada reacción de oxidación química a irradiaciones o a la acción de enzimas más o menos específicas. Estas reacciones secundarias pueden permitir, en especial, el control de la liberación del mencionado producto.

En el caso de una liberación directa, el producto liberado corresponde a la fórmula $R'_7R'_8C1 = X$ y/o $R'_9R'_{10}C2 = Y$ en las que R'_7 a R'_{10} , X e Y tienen las mismas significaciones que anteriormente.

En el caso de una liberación indirecta, el producto liberado corresponde al producto de al menos una reacción secundaria efectuada en al menos un compuesto de fórmula $R'_7R'_8C1 = X$ o $R'_9R'_{10}C2 = Y$, en las que R'_7 a R'_{10} , X e Y tienen las mismas significaciones que anteriormente.

El producto liberado de manera directa o indirecta puede detectarse, se habla entonces de producto detectable correspondiente a una molécula volátil detectable, a una sustancia activa detectable o también a un compuesto específico detectable.

En el caso de la liberación directa o indirecta de una molécula volátil, de una sustancia activa o de un compuesto específico, el compuesto de fórmula (II') permite liberar, después de la oxidación química, respectivamente al menos una molécula volátil, al menos una sustancia activa o al menos un compuesto específico.

Se sabe que, por ejemplo, los grupos pinacoles o los grupos dioles vecinales, así como los grupos aminoalcoholes, no son sensibles a la oxidación del aire y no son volátiles. Por lo tanto, pueden utilizarse como derivados estables de la molécula volátil, que será liberada en especial de manera controlada por exposición de los mencionados derivados a un agente oxidante, como el peryodato.

Así, en el caso en que el producto liberado corresponda a una molécula volátil, el método de la invención puede utilizarse para realizar un difusor de una molécula volátil, de modo que esta molécula volátil será liberada progresivamente a partir de un sustrato por una oxidación química del mismo.

En el caso de que el producto corresponda a una sustancia activa, el método de la invención puede utilizarse para liberar una forma galénica de un medicamento.

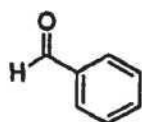
La presente invención describe también una composición que comprende un compuesto de fórmula (II') a partir del cual se puede liberar un producto de manera directa o indirecta por el método de la invención.

Esta composición puede ser útil, a modo de ejemplo, para la preparación de un difusor de una molécula volátil, que comprenda una mezcla de al menos un compuesto de fórmula (II') y un oxidante como el peryodato.

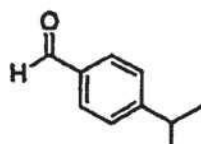
Según un modo de realización preferido, la composición descrita en la presente invención comprende una matriz sólida inerte o una forma galénica de un medicamento.

A modo de ejemplo, la molécula volátil puede ser un perfume o una molécula bioactiva, como una feromona. Se consideran entonces respectivamente un difusor de perfume o un difusor antimosquitos.

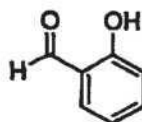
Más especialmente, la molécula volátil se elige entre el grupo que comprende: el benzaldehído (almendra artificial), el butanal, el citronelal, el anisaldehído, la mentona, el cuminaldehído, el salicilaldehído (utilizado en perfumería), la vainillina, el fenilacetaldéhid (jacinto) o el isovaleraldehído (limón, menta, eucalipto).



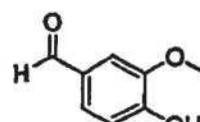
benzaldehído
(almendra artificial)



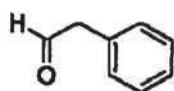
cuminaldehído
(comino, mirra)



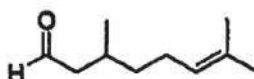
salicilaldehído
(perfumería)



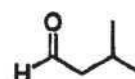
vainillina



Fenilacetaldéhid
(jacinto)



citronelal



isovaleraldehído
(limón, menta, eucalipto)

Ventajosamente, la sustancia activa como se define en **la presente** invención se elige entre el grupo que comprende: la testosterona, la estrona o la nicotina.

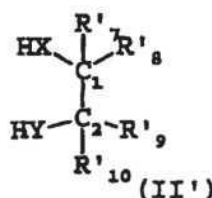
El método de liberación del producto puede comprender, por otra parte, una etapa preliminar de preparación del compuesto de fórmula (II') por cualquier técnica conocida por el especialista.

Se trata, por ejemplo, de la preparación de un derivado estable de una molécula volátil o de una sustancia activa o de un compuesto específico.

Puede tratarse, por ejemplo, de la preparación de un diol vecinal o de un aminoalcohol del mencionado producto por cualquier técnica conocida por el especialista.

Según una realización especial, **se describe también en la presente invención** un método de liberación de al menos un producto que comprende las etapas siguientes:

a) la preparación de un compuesto de fórmula (II').



en la que el enlace C1-C2 es sensible a una ruptura por una reacción de oxidación química, y R'7, R'8, R'9, R'10 X e Y tienen la misma significación que anteriormente,

(b) la oxidación química del compuesto de fórmula (II') obtenido en la etapa (a) que rompe el enlace C1-C2 para obtener el mencionado producto.

La etapa (a) de preparación puede comportar al menos una transformación química y/o al menos una transformación enzimática.

La preparación del compuesto de fórmula (II') puede realizarse, por ejemplo, por obtención de la forma reducida de la función cetona o aldehído de al menos uno del mencionado producto de fórmula R'9R'10C2 = Y y/o R'7R'8C1 = X.

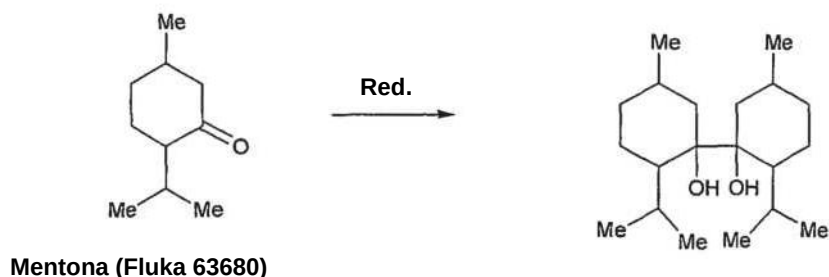
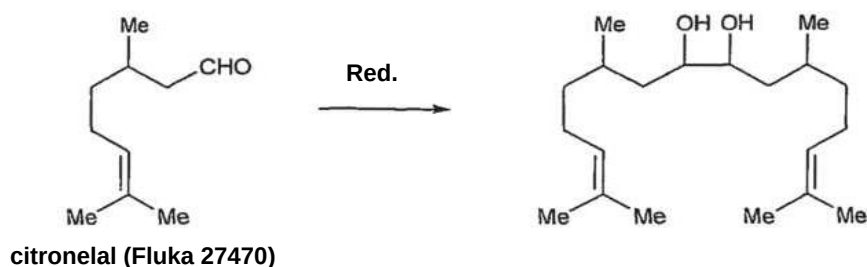
Así, la etapa (a) puede ser, por ejemplo, una reacción de dimerización de al menos una molécula volátil, en especial de un aldehído o una cetona.

Ventajosamente, la reacción de dimerización de la etapa (a) del método de liberación de un producto de la invención puede efectuarse por biosíntesis de los dioles vecinales.

Estas reacciones de dimerización de un producto para obtener un derivado estable son, por ejemplo, las descritas en la figura 7 en anexo, en la que:

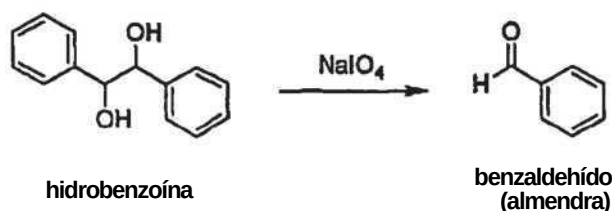
- Una primera reacción de dimerización según la etapa (a) es una dimerización reductora del aldehído 1 o de la cetona 2 del producto liberado en presencia de zinc, a fin de obtener un grupo pinacol.
- Una segunda reacción de dimerización según la etapa (a) se realiza en dos etapas, por olefinación del carbonilo en presencia de un iluro fosforado, seguida de una dihidroxilación por tetróxido de osmio. Esta segunda vía conduce a un diol terminal que, después de oxidación por el peryodato de sodio, libera 1 equivalente de formaldehído.

A modo de ejemplos de síntesis de un compuesto de fórmula (II'), en el caso de las moléculas volátiles, se pueden citar:



Se detallan realizaciones especiales del método de liberación de una molécula volátil efectuadas por el solicitante en el marco de la presente invención en los ejemplos siguientes, en los que se realizan dioles:

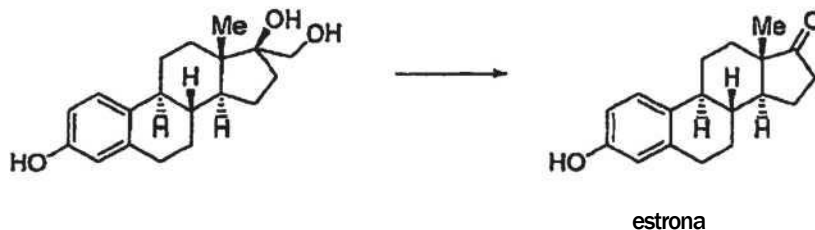
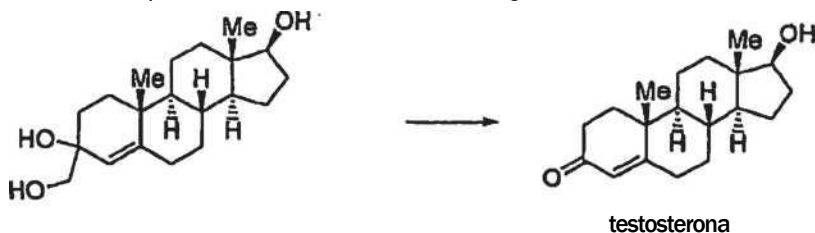
- 1 - Un diol simétrico, la hidrobenzoína, obtenido por reducción con borohidruro de sodio de la benzoína, permite obtener por oxidación química el benzaldehído, con olor a almendra.
- 2 - También se ilustra la oxidación del 1,2-pentanodiol, que libera un aldehído alifático, el butanal, con olor a mantequilla.





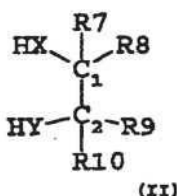
10 Se detallan realizaciones especiales del método de liberación de una sustancia activa en los ejemplos siguientes.

Los dos primeros ejemplos corresponden a liberaciones directas de la sustancia activa y el último ejemplo a una liberación indirecta en la que la reacción de oxidación va seguida de una beta eliminación.



30 El método descrito en la presente invención es remarcable por cuanto el producto liberado es un producto detectable y puede utilizarse para detectar una transformación química.

35 Ventajosamente cuando la liberación de un producto detectable el compuesto de fórmula (II') es un compuesto de fórmula (II)



45 en la que,

- 50
- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula $\text{-NR}_{11}\text{R}_{12}$, R_{11} se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R_{12} no es un átomo de hidrógeno,
 - R_7 a R_{10} , idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no, y al menos uno de los grupos R_7 a R_{10} es un grupo Di, que es insensible a la reacción de oxidación química de la etapa (b) y que presenta propiedades detectables, directamente o indirectamente, solo o en combinación, después de la ruptura del enlace $\text{C}_1\text{-C}_2$.
- 55

60 Estas propiedades son características del producto detectable.

A modo de ejemplos, estas propiedades pueden ser biofísicas, biológicas o químicas, como, en especial, una variación de tipo espectral o una variación de solubilidad.

El compuesto de fórmula (II) corresponde a una realización especial del compuesto de fórmula (II'), así pues, las consideraciones hechas para el compuesto de fórmula (II') son válidas para el compuesto de fórmula (II).

El producto detectable puede entonces liberarse después de haber efectuado una primera etapa de transformación química de un sustrato para obtener un compuesto de fórmula (II) y después de una segunda etapa de oxidación química del mencionado compuesto de fórmula (II).

La presente invención concierne pues muy especialmente a un método de detección de una transformación química de un sustrato de modo que la mencionada transformación química de este sustrato libera un producto. El mencionado producto liberado es entonces un producto detectable.

La invención concierne también a la utilización de sustratos susceptibles de ser utilizadas en este método. La invención concierne además a la utilización de este método en un procedimiento de detección y eventualmente de cuantificación de una transformación química en una muestra.

Numerosos sustratos liberan, después de reacción, un producto que da una señal fácilmente identificable. Se pueden citar los ejemplos bien conocidos de los glucósidos, los ésteres y los fosfatos de fenoles, cuya hidrólisis libera directamente fenol, que se detecta, en general, por su color (sustrato cromógeno) o su fluorescencia (sustrato fluorógeno (D. C. Demirjian, P. C. Shah, F. Moris-Varas, *Top. Curr. Chem.* 1999, 200, 1; M. T. Reetz, K. E. Jaeger, *Top. Curr. Chem.* 1999, 200, 31).

También se puede citar el 2-metoxi-1-naftalenometanol, cuya oxidación da 2-metoxi-1-naftaldehído fluorescente (B. L. Vallee, patente US 5,162,203; B. List, C. F. Barbas, R. A. Lemer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 15351 for utilisation in aldolases).

Estos tipos de sustrato tienen una ventaja importante: el fenol cromógeno o fluorógeno es un grupo fuertemente activado, lo cual hace a estos sustratos inestables y susceptibles de reacciones inespecíficas. En el caso del 2-metoxi-1-naftalenometanol, el problema es similar, puesto que la posición bencílica es sensible a la oxidación inespecífica.

Una segunda clase de sustrato conduce a la revelación de un producto obtenido tras reacción secundaria enzimática y/o espontánea. Existen algunos ejemplos, como sustratos de penicilinasa (patente US 5,583,217), sustratos de alcohol deshidrogenasa (ADH) (G. Klein, J. L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 1113) y sustratos de aldolasa (N. Jourdain, R. Pérez Carlón, J. L. Reymond, *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 9415).

También se puede señalar la existencia de un sustrato para medir el NADH (C. A. Roeschlaub, N. L. Maidwell, M. R. Rezaï, P. G. Sammes, *Chem. Commun.* 1999, 1637).

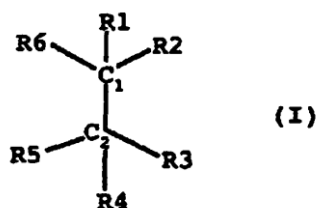
Finalmente, se pueden citar sustratos cuyo producto de la reacción secundaria detectado se obtiene por la acción de la beta-galactosidasa (K. L. Matta, C. F. Piskorz, J. J. Barlow, *Carbohydr. Res.* 1981, 90, C1-C3) o por la ADH (G. Klein, J. L. Reymond, *Helv. Chim. Acta* 1999, 82, 400).

Esta segunda clase de sustrato es más estable. Sin embargo, esta segunda clase de sustratos se limita a usos especiales, porque el hecho de utilizar una enzima para la reacción secundaria representa un inconveniente en términos de coste y de flexibilidad.

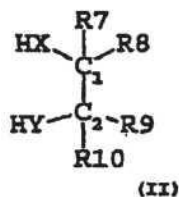
Los trabajos de investigación efectuados en el marco de la presente invención han consistido, en especial, en desarrollar un método de detección de una transformación química. Así, la presente invención se propone resolver los inconvenientes descritos anteriormente utilizando un método de medida de una transformación química fiable, sensible y reproducible, que utiliza un sustrato estable en el medio en el que se produce la reacción química, y de manera que las transformaciones sucesivas liberan un producto detectable.

La detección de esta transformación se obtiene utilizando el método de liberación de un producto detectable, es decir efectuando una transformación química de un sustrato que conduce al compuesto de fórmula (II) y después oxidando químicamente el compuesto de fórmula (II) para liberar el producto que puede ser detectado. En este caso, la liberación del producto detectable comprende las etapas siguientes:

a) la transformación química de un sustrato de fórmula (I) en la que el enlace C1-C2 es insensible a una ruptura por una reacción de oxidación química **efectuada por medio de un agente químico oxidante**:



en un compuesto de fórmula (II) en la que el enlace C₁-C₂ es sensible a una ruptura por una reacción de oxidación química:



y,

(b) la oxidación química del compuesto de fórmula (II) obtenido en la etapa (a) que rompe el enlace C₁-C₂ para obtener directamente o indirectamente un producto detectable,

y en que en los compuestos de fórmulas (I) y (II):

- al menos uno de los grupos R₁ a R₆ es un grupo Di como se ha definido anteriormente,
- los grupos R₁ a R₆, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no y un grupo funcional sustituido o no y, en el caso de un grupo funcional de fórmulas -OR₁₂, -SR₁₂, -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,
- el o los grupos R₁ a R₆ que forman, después de la etapa (a), los grupos de fórmulas -XH y -YH son insensibles a la oxidación de la etapa (b) o pueden ser sensibles a esta oxidación si el compuesto de fórmula (I) correspondiente no conduce durante una oxidación del tipo de la de la etapa (b) al compuesto de fórmula (II),
- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR₁₁R₁₂,
- R₇ a R₁₀, idénticos o diferentes, o bien idénticos a cuatro como máximo de los grupos R₁ a R₆, o bien, debido a la transformación de uno o varios de los grupos R₁ a R₆, durante la reacción de la etapa (a), se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no, y al menos uno de los grupos R₇ a R₁₀ es un grupo Di como se ha definido anteriormente.

El método de la invención comprende evidentemente, después de la etapa (b), una etapa de detección directa o indirecta del producto detectable, para efectuar, por ejemplo, la detección de la transformación química de la etapa (a).

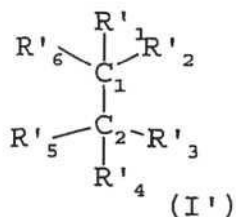
El método del invento admite varias significaciones preferidas de los grupos R₁ a R₆, entre las cuales se consideran de forma más especial los casos siguientes:

- R₁ a R₆ se eligen de manera que el enlace C₁-C₂ forme parte de al menos un ciclo,
- al menos un par de los grupos R₁ a R₆ forman juntos un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo de fórmula -NR₁₁R₁₂,
- como máximo un par de grupos R₁ a R₆, uno de los cuales se elige entre R₁, R₂ y R₆ y el otro se elige entre R₃, R₄ y R₅, forman un doble enlace entre los carbonos C₁ y C₂,
- como máximo dos pares de los grupos R₁ a R₆, uno de los cuales se elige entre R₁, R₂ y R₆ y el otro se elige entre R₃, R₄ y R₅, forman un triple enlace.

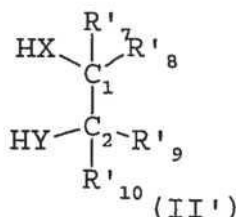
Un ejemplo de esquema de detección de una transformación química de un sustrato según la invención se representa en la figura 1, en anexo. Los compuestos de fórmulas (III) y (IV) se detectan directa o indirectamente.

Una forma ventajosa de realización del método de liberación de un producto detectable comprende las etapas siguientes:

- a) la transformación de un sustrato de fórmula (I') en la que el enlace C₁-C₂ es insensible a una ruptura por una reacción de oxidación química:



en un compuesto de fórmula (II') en la que el enlace C₁-C₂ es sensible a una ruptura por una reacción de oxidación química:



y,

(b) la oxidación química del compuesto de fórmula (II') obtenido en la etapa (a) en presencia de un compuesto de fórmula II, que rompe el enlace C₁-C₂ para obtener directamente o indirectamente al menos un producto detectable,

en que, en el compuesto de fórmula (I'):

- los grupos R'₁ a R'₆, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no y un grupo funcional sustituido o no y, en el caso de un grupo funcional de fórmulas -OR₁₂, -SR₁₂, -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,
- el o los grupos R'₁ a R'₆ que forman, después de la etapa (a), los grupos de fórmulas -XH y -YH son insensibles a la oxidación de la etapa (b) o pueden ser sensibles a esta oxidación si el compuesto de fórmula (I') correspondiente no conduce durante una oxidación del tipo de la de la etapa (b) al compuesto de fórmula (II'),

en el compuesto de fórmula (II'):

- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,
- R'₇ a R'₁₀, idénticos o diferentes, o bien idénticos a cuatro como máximo de los grupos R'₁ a R'₆, o bien, debido a la transformación de uno o varios de los grupos R₁ a R₆, durante la reacción de la etapa (a), se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no y,

en el compuesto de fórmula (II):

- R₇ a R₁₀, idénticos o diferentes, corresponden a un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, un grupo funcional sustituido o no, y al menos uno de los grupos R₇ a R₁₀ es un grupo Di como se ha definido anteriormente.
- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR₁₁R₁₂, R₁₁ se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R₁₂ no es un átomo de hidrógeno,

Esta forma de realización ventajosa pone en competición el compuesto de fórmula (II'), procedente de la transformación química del compuesto de fórmula (I'), con el compuesto de fórmula (II) durante la etapa (b) de oxidación. La velocidad de oxidación del compuesto de fórmula (II) disminuirá pues proporcionalmente a la cantidad de compuesto de fórmula II' formado. La señal asociada a la transformación del compuesto de fórmula (II), detectable gracias a la presencia de un grupo Di precursor de un producto detectable, también disminuirá proporcionalmente a la cantidad de compuesto de fórmula (II') producido.

De esta manera, se puede detectar por medio del compuesto de fórmula (II) la reacción química que transforma el compuesto de fórmula (I') en compuesto de fórmula (II').

En esta forma de realización ventajosa, el sustrato de fórmula (I') puede corresponder al sustrato específico no modificado de la transformación química como, por ejemplo, el sustrato específico no modificado de una enzima.

El método de la invención acepta igualmente una modificación de uno de los grupos R_7 a R_{10} aparte de Di, por el oxidante químico de la etapa (b), a condición de que esto no altere la ruptura del enlace C1-C2 durante la etapa (b) ni durante la detección posterior.

En una forma especial de realización del procedimiento de la invención en que las etapas (a) y (b) son simultáneas, el o los grupos R_1 a R_6 son insensibles a la oxidación de la etapa (b).

En estas condiciones, la reacción de transformación química y de oxidación química tienen lugar en las mismas condiciones experimentales. Cuando las etapas (a) y (b) se efectúan simultáneamente, el perfil de la señal obtenida puede informar sobre el desarrollo cinético de la transformación, si esta es limitante en el proceso, es decir más lenta que la oxidación.

En otra forma de realización, las etapas (a) y (b) no son simultáneas. Los grupos R_1 a R_6 son entonces sensibles o no a la oxidación de la etapa (b). La reacción de transformación (a) puede tener lugar en condiciones experimentales parecidas o no a la reacción de oxidación (b). Cuando las etapas (a) y (b) no son simultáneas, se obtendrá una velocidad de reacción proporcional a la cantidad de producto acumulado.

El método de la invención puede realizarse con un sustrato que comprende varios grupos químicos susceptibles de ser transformados en la etapa (a) y varios grupos químicos precursores de productos detectables.

Según la transformación química estudiada y/o la estructura del sustrato utilizado, el método de la invención podrá realizarse en un medio reactivo adecuado elegido entre un medio acuoso, orgánico, bifásico o sólido.

En este caso, se entiende por:

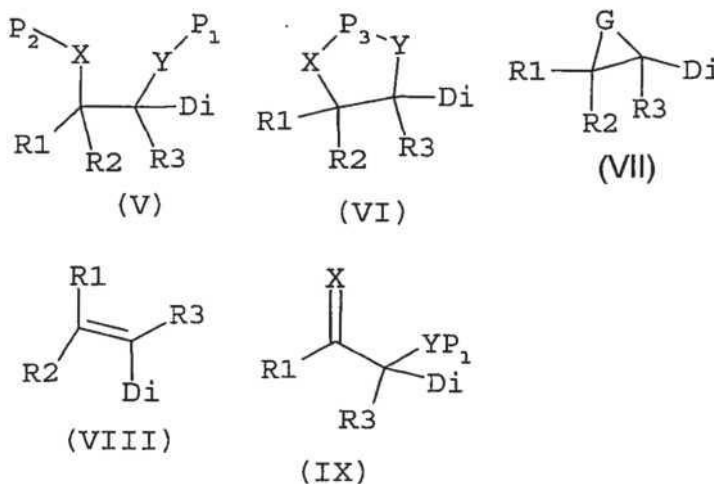
- transformación química o reacción química, cualquier transformación de un sustrato que puede ser espontánea o no y que puede necesitar unas condiciones experimentales especiales, como el calor, los UV, etc. En el caso de una transformación química no espontánea, la reacción puede necesitar un reactivo químico o un catalizador, como una enzima. Esta transformación química de la etapa (a) puede realizarse por medio de varias reacciones secuenciales, simultáneas o no.

Los grupos R_1 a R_{10} , sea cual sea su significación, pueden estar constituidos o comprender un isótopo como, por ejemplo, el deuterio. Por otra parte, ventajosamente, los grupos R_1 a R_{10} son estables en un medio reactivo, en especial acuoso, orgánico, bifásico, sólido, etc.

Ventajosamente, el sustrato utilizado en el procedimiento de la invención comprende uno o varios centros quirales. El sustrato utilizado en el procedimiento de la invención puede pues estar constituido por una mezcla de enantiómeros o de diastereoisómeros o de enantiómeros puros.

Los sustratos preferidos que responden a la fórmula I se describen a continuación.

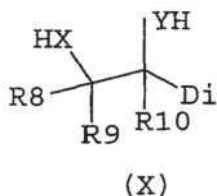
Una primera clase de sustrato (I) responde a las fórmulas (V) a (IX) siguientes:



en las que:

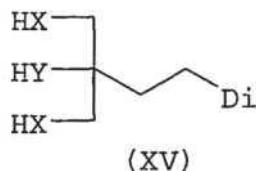
- Di es un grupo como se ha definido anteriormente
- R₁ a R₃ y X e Y tienen las mismas significaciones que anteriormente,
- Como máximo uno de los grupos P₁ y P₂ es un átomo de hidrógeno. P₁ P₂, idénticos o diferentes, se eligen entre un grupo acilo sustituido por un grupo arilo o alquilo o peptídilo, un grupo fosfato, un grupo éster fosfato, un grupo fosfonato, un grupo carbamilo sustituido por un grupo arilo o acilo o peptídilo, un grupo glucosilo y un grupo sulfato,
- P₃ se elige entre un grupo carbonilo, un grupo -PO₂R₁₁ o un grupo R₁₁PO-, en que R₁₁ presenta la misma significación que anteriormente, un grupo -SO₂, un grupo -CHOR₁₃, en que R₁₃ representa un grupo arilo, alquilo o glucosilo, un grupo SiR₁₄R₁₅, en que R₁₄ y R₁₅, idénticos o diferentes, representan un grupo arilo, alquilo, ariloxi o alcoxi y un grupo AsO₂H-
- G se elige entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y un grupo amino de fórmula NR₁₁R₁₂, en el que R₁₁ tiene la misma significación que anteriormente.

El producto del sustrato obtenido después de la primera etapa del método de la invención a partir de los sustratos de fórmulas (V), (VI), (VII), (VIII) y (IX) responde a la fórmula (II) o ventajosamente a la fórmula (X) siguiente:



en la que Di, X, Y, R₈, R₉, y R₁₀ tienen la misma significación que anteriormente.

En un caso particular, el producto del sustrato obtenido después de la primera etapa (a) de transformación química de la invención a partir de los sustratos de fórmulas (I) también puede responder a la fórmula (XV) siguiente:



en la que X, Y y Di tienen la misma significación que anteriormente, y la cadena que contiene Di puede estar en posición 1, 2 o 3 del derivado glicerolado.

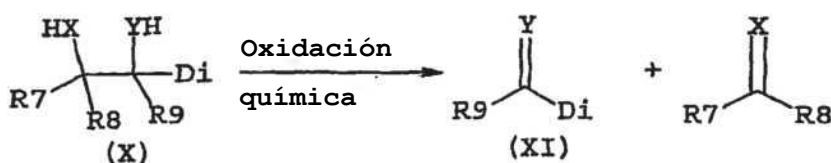
De forma totalmente preferente, los grupos X e Y del compuesto de fórmula (XV) son grupos hidroxilos.

La detección de la transformación química según la invención se realiza o bien por una revelación directa, o bien por una revelación indirecta del compuesto obtenido después de la oxidación química del compuesto de fórmulas (II) o (X) efectuada por medio de un agente químico oxidante según la etapa (b).

El peryodato de tetrapropilamonio, soluble en fase orgánica, se utiliza ventajosamente cuando el método de la invención se realiza en medio orgánico.

Según un modo de revelación preferida, en adelante denominado revelación directa, según la cual el compuesto que responde a la fórmula (XI) obtenido después de la reacción de oxidación química efectuada en el derivado que responde a las fórmulas (II) o (X) después de la etapa (b), es directamente detectable, según el esquema siguiente.

Revelación directa



Un modo de realización de la invención con una revelación directa realiza la detección directa de una propiedad del compuesto de fórmula (XI), no presente en los compuestos de fórmulas (I) o (II) o (X).

En un modo de revelación directa o de liberación directa de un producto detectable:

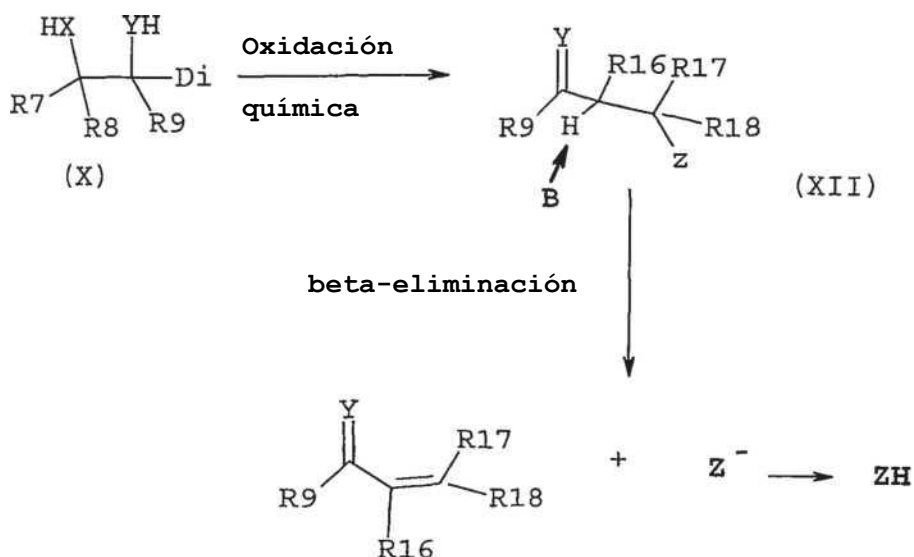
- Di en el compuesto de fórmula (X) es un precursor de un producto detectable, y
- Di en el compuesto de fórmula (XI) es directamente detectable.

A modo de ejemplos no limitativos, se puede citar, entre estas propiedades del compuesto (XI), una propiedad física, como la solubilidad, una propiedad fisicoquímica, como una propiedad espectral, o una propiedad biológica, como la activación de una enzima, un olor o la acción de una feromona.

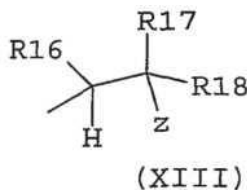
La molécula que responde a la fórmula (XI) puede corresponder a cetonas aromáticas, por ejemplo una cetona beta-aromática, que se detecta por una variación espectral, un aldehído como el benzaldehído o el citronelal, que se detecta por el olor, o a una feromona, que se detecta por la atracción de insectos. (Suzuki et al., (1980). Agric. Biol. Chem. 44, 2519 y Millar et al. (1996). Bioorg. Med. Chem. 3, 331-340).

En un segundo modo de revelación preferida, en adelante denominado revelación indirecta, el compuesto (XII), obtenido después de la etapa (b) de oxidación química del compuesto de fórmulas (II) o (X), sufre una reacción de beta-eliminación que conduce al producto detectable ZH, según el esquema siguiente.

Revelación indirecta



el grupo Di, que responde a la fórmula (XIII) siguiente:



en la que:

- R₁₆, R₁₇ y R₁₈ idénticos o diferentes, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no o un grupo funcional sustituido o no, y
- Z es un precursor del producto detectable ZH.

En este modo de revelación indirecta o de liberación indirecta de un producto detectable:

- Di en los compuestos de fórmulas (X) y (XII) es el precursor del mencionado producto detectable que se liberará después de una reacción secundaria de beta-eliminación.

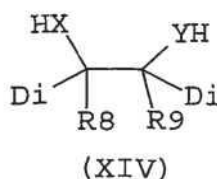
En este modo de realización de la invención con una revelación indirecta, se realiza la detección de una propiedad del producto ZH obtenido por una reacción de beta-eliminación efectuada en el compuesto de fórmula (XII) obtenido después de la etapa (b) de oxidación química. Esta reacción de beta-eliminación, ventajosamente espontánea, se realiza preferentemente en presencia de una base llamada B, que puede corresponder a la albúmina

de suero bovino (BSA).

Entre las propiedades del compuesto ZH, se pueden citar a modo de ejemplos no limitativos una propiedad física como la solubilidad, una propiedad fisicoquímica como una propiedad espectral o una propiedad biológica como la inducción de crecimiento de bacterias.

El compuesto ZH se elige entre un alcohol aromático, un alcohol heteroaromático, una amina heteroaromática, un átomo de halógeno o un éster fosfórico. A modo de ejemplos no limitativos, pueden citarse la fluoresceína, la fenoltaleína, el rojo de fenol, el p-nitrofenol, el o-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el ácido 6-hidroxinaftoico, el ácido 8-hidroxipireno 1,3,6-trisulfónico, la tirosina, la luciferina, el indolilo, el 5-bromo-4-cloro-indolilo, el quinolinio, el nitroanilinio o la piridoxamina.

En un tercer modo de revelación preferida, el compuesto obtenido después de la etapa (a) de transformación química del sustrato responde a la fórmula XIV siguiente:



en la que:

- Di, R8, R9, X e Y tienen las mismas significaciones que anteriormente y,
- los dos grupos Di, idénticos o diferentes, uno unido al carbono C₁ y el segundo unido al carbono C₂, interactúan entre sí.

En este caso, la ruptura del enlace C₁-C₂ en este compuesto (XIV) provoca una variación espectral detectable.

Un ejemplo no limitativo de interacción entre los dos grupos Di es una transferencia de energía de tipo FRET.

Un esquema que representa esta revelación que realiza una transferencia de energía de tipo FRET se presenta en la figura 2, en anexo.

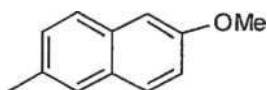
Ejemplos de sustratos que permiten la realización de la invención con una revelación directa son compuestos de fórmula (V) en los que los grupos X, Y, R₁, R₂, R₃ y Di se eligen entre los descritos en la tabla siguiente.

Para todos los compuestos descritos en las tablas siguientes, que ilustran ejemplos particulares de sustratos según la invención, la estereoquímica se realiza siempre en todas las variantes posibles.

Tabla 1

N.º	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	Di
6	NH	O	H	H	H	6'-metoxi-2'-naftil
7	NH	O	COOH	H	H	6'-metoxi-2'-naftil
8	NH	O	CONH-péptido	H	H	6'-metoxi-2'-naftil
17	O	O	H	H	H	6'-metoxi-2'-naftil

El grupo 6'-metoxi-2'-naftil corresponde a la fórmula:

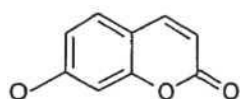


Ejemplos de sustratos que permiten la realización de la invención con una detección indirecta son compuestos de fórmula (V) en los que los grupos X, Y; R₁₁, R₁₂, R₁₃, así como los grupos R₁, R₂, R₃ y ZH se eligen entre los descritos en la tabla II siguiente.

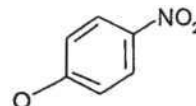
Tabla II

						Di			
N.º	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁₆	R ₁₇	R ₁₈	Z
1	NH	O	H	H	H	H	H	H	Cum*/NP**
2	NH	O	CH ₂	H	H	H	CH ₂	H	Cum*/NP**
3	NH	O	COOH	H	H	H	H	H	Cum*/NP**
4	NH	O	CONH-péptido	H	H	H	H	H	Cum*/NP**
5	NH	O	H	H	Me	H	H	H	Cum*/NP**
9	O	O	H	H	H	H	H	H	Cum*/NP**
10	O	O	Me	Me	H	H	H	H	Cum*/NP**
11	O	O	H	CH ₂	H	H	CH ₂	H	Cum*/NP**
12	O	O	(MeO)CHO	H	H	O-CH(OMe)	H	H	Cum*/NP**
13	O	O	H	H	Me	H	H	H	Cum*/NP**
14	O	O	Et	H	H	H	H	H	Cum*/NP**
15	O	O	(MeO)CHO	H	H	O-CH(OMe)	H	H	Cum*/NP**
16	O	O	(Ade)CHO	H	H	O-CH(Ade)	H	H	Cum*/NP**
18	NH	NH	H	H	H	H	H	H	Cum*/NP**

* Cum = 7-oxicumarina

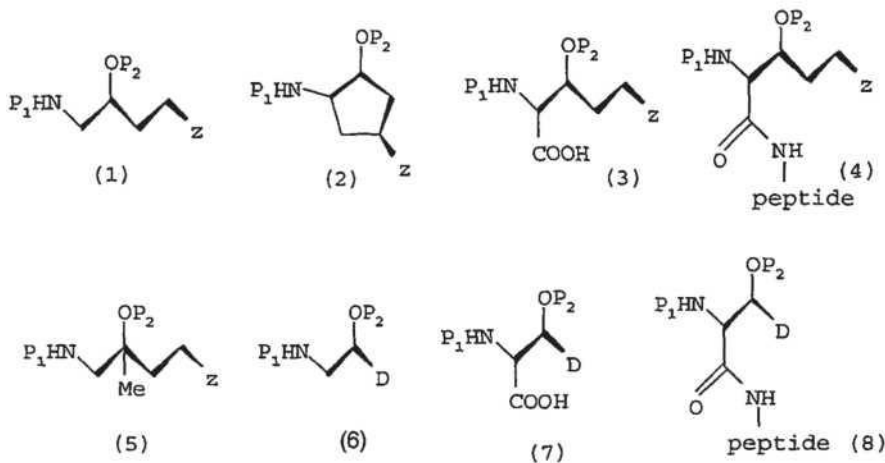


** NP = paranitrofenoxi

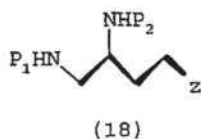


Las estructuras correspondientes a los sustratos de la tabla II se representan a continuación:

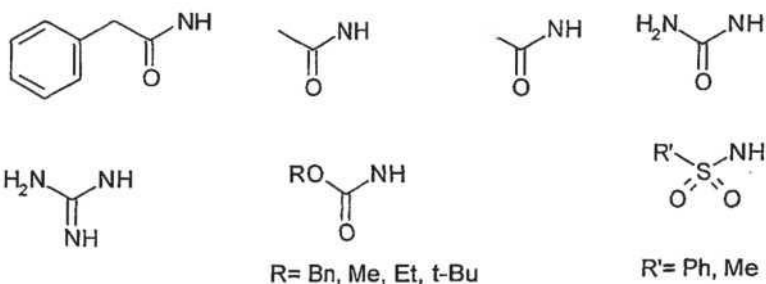
- Aminoalcoholes



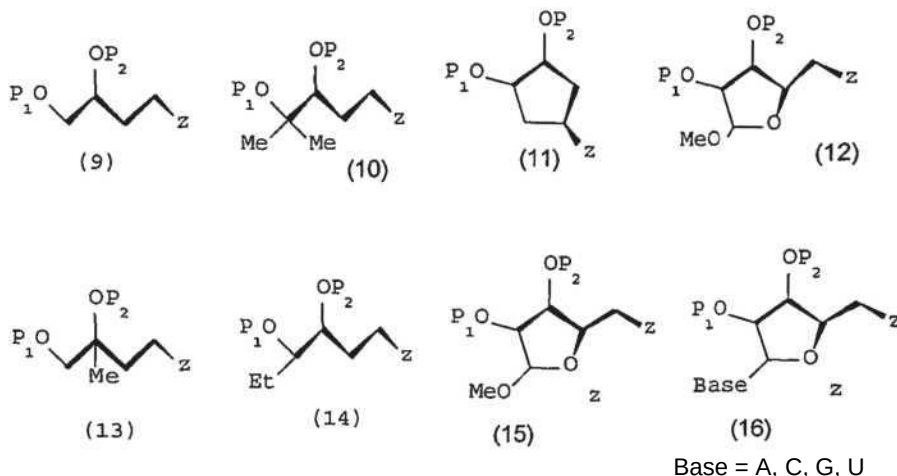
- Diaminas



Las diaminas pueden ser mono o disustituidas, los grupos P1 y P2 no pueden corresponder los dos a H. P1 y/o P2 pueden corresponder a:

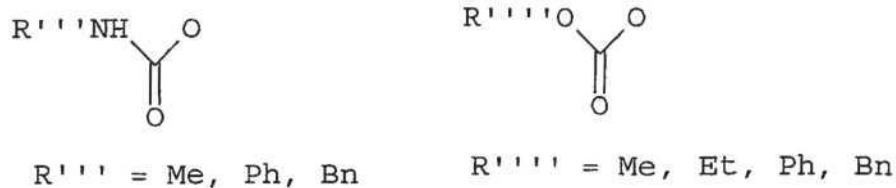
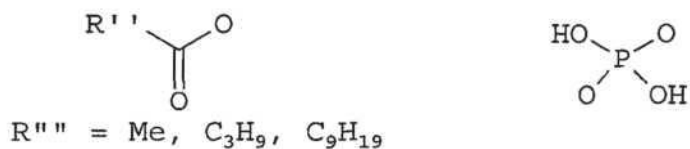


- Dioles:

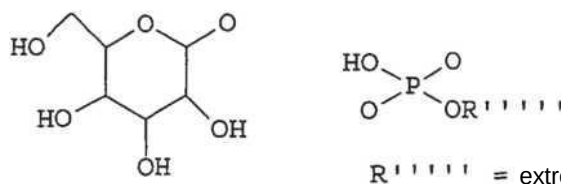


Los dioles pueden ser mono o disustituidos.

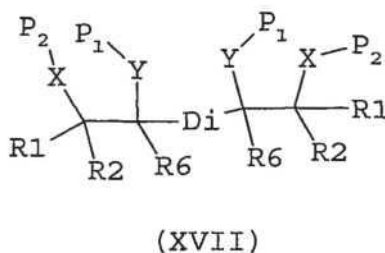
En el caso particular de una disustitución, los dos radicales hidroxilo pueden ser sustituidos idénticamente como sigue:



En el caso de una monosustitución, a modo de ejemplo particular, los radicales hidroxilo pueden ser monofuncionalizados como anteriormente, y además como sigue:

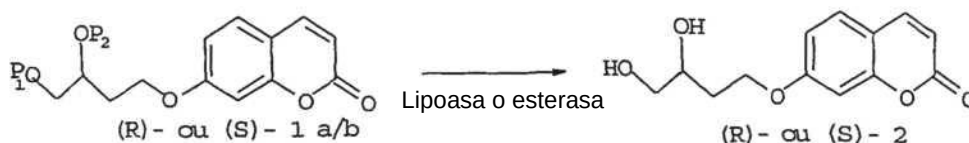


A modo de ejemplo particular de realización de la invención, la revelación de la etapa (b) se realiza de manera secuencial utilizando sustratos al menos disustituídos como el sustrato disustituído de la fórmula XVII siguiente,

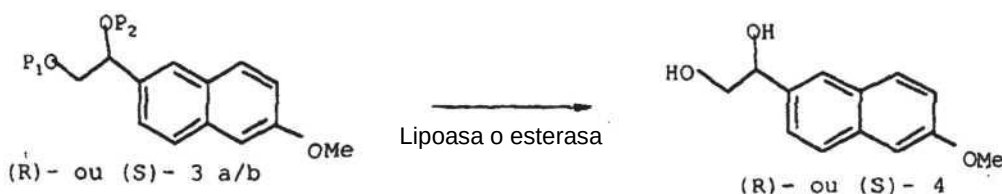


en la que: Di , R_1 , R_2 , R_6 , P_1 , P_2 , X e Y tienen las mismas significaciones que anteriormente.

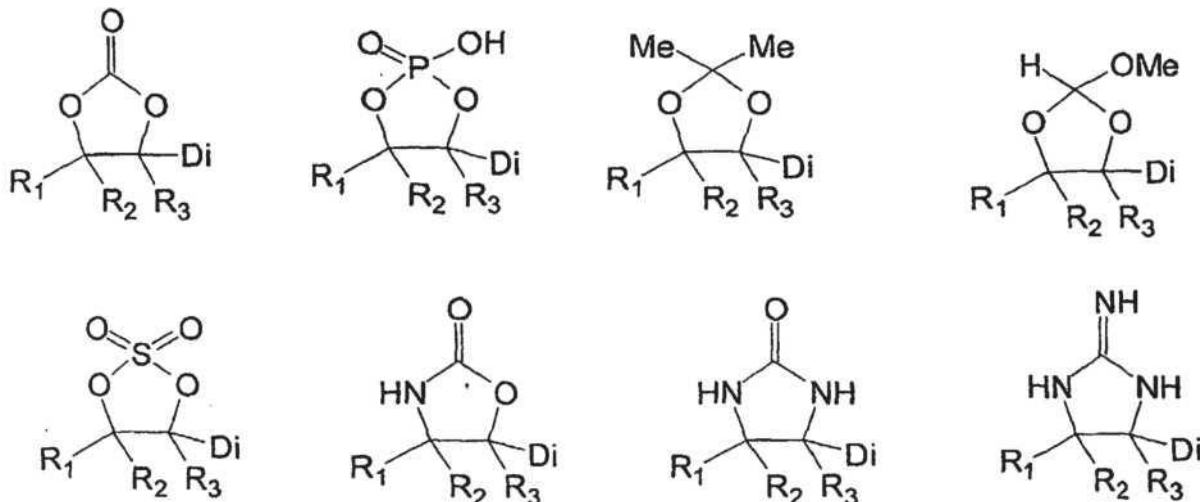
Un modo preferido de realización del método de la invención que utiliza un sustrato que responde a la fórmula (V) anterior comprende la transformación de derivados mono o diésteres de los dioles (1 a/b) por una lipasa o una esterasa para conducir al compuesto (2) conforme al esquema siguiente.



Otro modo preferido de realización del método de la invención que utiliza un sustrato perteneciente a la segunda clase anterior comprende la transformación de derivados mono- o diésteres de los dioles (3 a/b) por una lipasa o una esterasa para conducir al compuesto (4) conforme al esquema siguiente.



A modo de ejemplo de sustratos de fórmula (VI), se pueden citar más especialmente los que corresponden a las fórmulas siguientes:



A modo de ejemplo de sustratos de fórmula (VII) utilizados en el método de la invención con una revelación directa, se pueden citar más especialmente los descritos en la tabla III siguiente:

Tabla III

N.º	Di						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁₆	R ₁₇	R ₁₈	Z
19	H	H	H	H	H	H	cum/NP
20	H	H	Me	H	H	H	cum/NP
21	Me	Me	H	H	H	H	cum/NP
22	Et	H	H	H	H	H	cum/NP
23	CH ₂ -	H	H	H	CH ₂ -	H	cum/NP

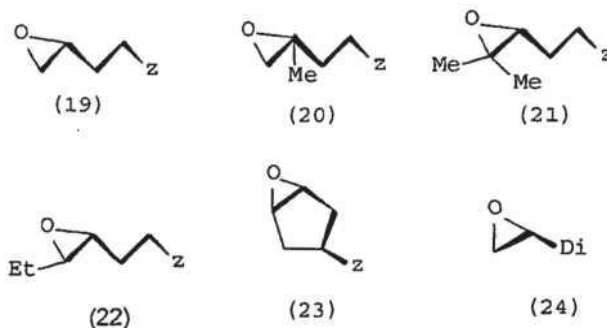
Cum y NP tienen las mismas significaciones que anteriormente.

A modo de ejemplo de sustratos de fórmula (VII) utilizados en el método de la invención con una revelación indirecta, se pueden citar más especialmente los descritos en la tabla IV siguiente:

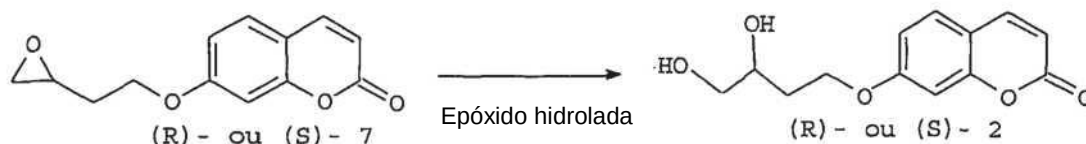
Tabla IV

N.º	R ₁	R ₂	R ₃	Di
24	H	H	H	naft

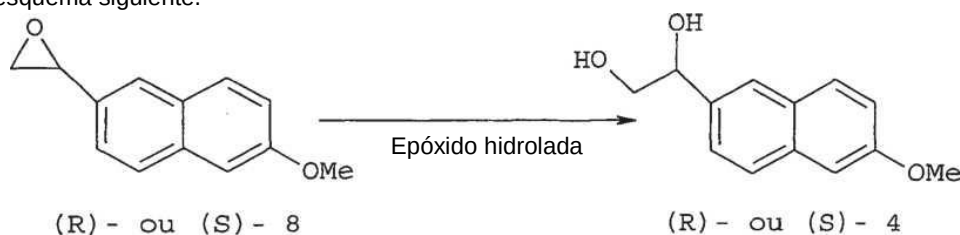
Las estructuras correspondientes a los sustratos de las tablas III y IV se representan a continuación.



Un modo preferido de realización del método de la invención que utiliza un sustrato que responde a la fórmula (VII) siguiente comprende la transformación del epóxido (7) por una epóxido esterasa para conducir al compuesto (2) conforme al esquema siguiente.



Otro modo preferido de realización del método de la invención que utiliza un sustrato que responde a la fórmula (VII) anterior comprende la transformación del epóxido (8) por una epóxido hidrolasa para conducir al compuesto (4) conforme al esquema siguiente.



A modo de ejemplo de sustratos de fórmula (VIII) utilizados en el método de la invención con una revelación indirecta, se pueden citar más especialmente los descritos en la tabla V siguiente, en que los grupos cum y NP tienen las mismas significaciones que anteriormente.

Tabla V

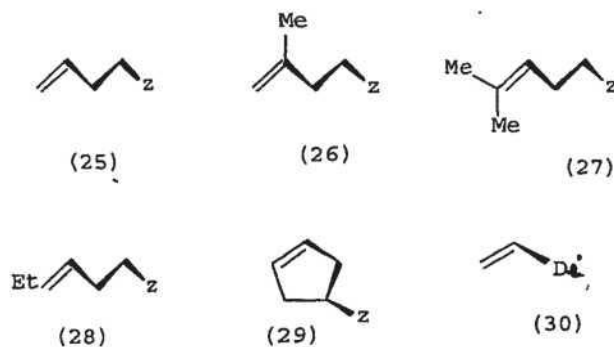
N.º				Di			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁₆	R ₁₇	R ₁₈	Z
25	H	H	H	H	H	H	cum/NP
26	H	H	Me	H	H	H	cum/NP
27	Me	Me	H	H	H	H	cum/NP
28	Et	H	H	H	H	H	cum/NP
29	CH ₂ -	H	H	H	CH ₂ -	H	cum/NP

A modo de ejemplo de sustratos de fórmula (VIII) utilizados en el método de la invención con una revelación directa, se pueden citar más especialmente los descritos en la tabla VI siguiente:

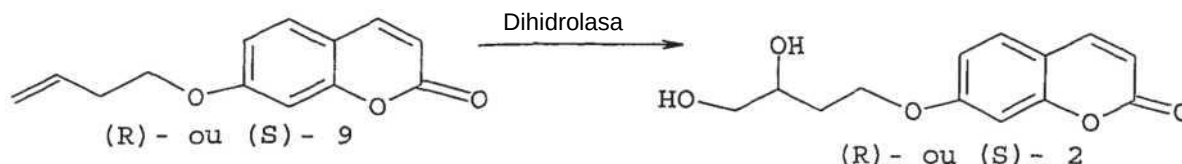
Tabla VI

N.º	R ₁	R ₂	R ₃	Di
30	H	H	H	naft

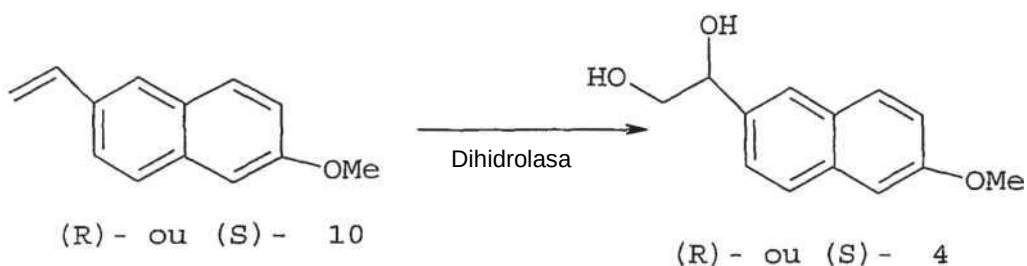
Las estructuras correspondientes a los sustratos de las tablas V y VI se representan a continuación.



Un modo preferido de realización de la etapa (a) del método de la invención que utiliza un sustrato según la fórmula (VIII) anterior comprende la transformación de la olefina (9) por una dihidroxilasa o un catalizador químico como un alcaloide o un aminoalcohol en presencia de OsO₄ para conducir al compuesto (2) conforme al esquema siguiente:

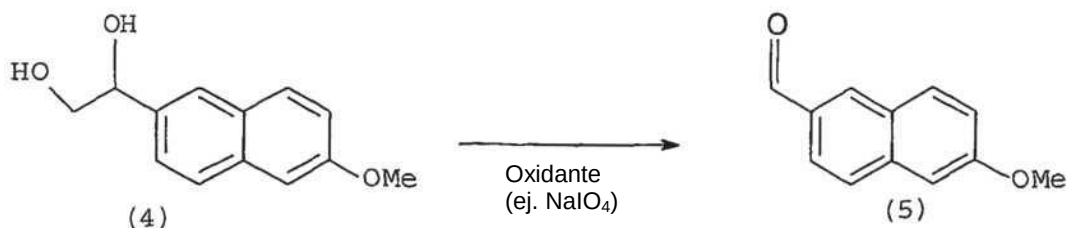


Otro modo preferido de realización de la etapa (a) del método de la invención que utiliza un sustrato según la fórmula (VIII) anterior comprende la transformación de la olefina (10) por una dihidroxilasa para conducir a compuesto (4) conforme al esquema siguiente.

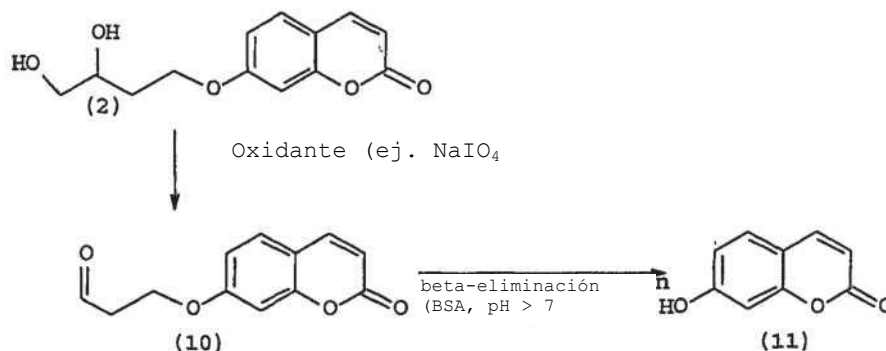


A modo de ejemplo de reacción de oxidación, según la etapa (b), de los productos procedentes de la etapa (a), se pueden citar las dos reacciones siguientes:

Con un método de revelación directa



Con un método de revelación indirecta



La presente invención describe también los sustratos que responden a las fórmulas (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX).

Estos sustratos presentan un interés particular y, en especial, son susceptibles de utilizarse en el método descrito anteriormente.

Ventajosamente, estos sustratos son estables en el medio reactivo, en especial en gamas de pH y de temperaturas muy amplias, pero también en disolventes muy diversos.

A modo de ejemplo, se representan sustratos susceptibles de ser utilizados en el método de la invención en la tabla XI, en anexo.

La invención describe también una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula (II').

Este compuesto de fórmula (II') puede corresponder a una forma estabilizada de una molécula volátil, de una sustancia activa o de un compuesto específico.

Ventajosamente, la composición según la invención comprende un agente oxidante.

El método de la invención es remarcable por cuanto permite detectar una transformación química eventualmente presente en una muestra eligiendo un sustrato lo más adaptado posible a la transformación que se quiere analizar.

Ventajosamente, estos sustratos presentan grados de especificidad diversos. Estos grados de especificidad son aportados por la estructura de uno o más grupos R₁ a R₆ de la fórmula (I) o R₁ a R₃ o G o P₁ a P₃ de las fórmulas (V), (VI), (VII), (VIII) o (IX).

A modo de ejemplo, en el caso de la detección de una transformación química efectuada por una lipasa, el o los grupos R_1 a R_6 se eligen para que los sustratos que responden a la fórmula (I) sean parecidos a la estructura del sustrato específico. En especial, pueden corresponder a una cadena de ácido graso. El especialista puede, en función del tipo de transformación química que se quiere detectar, adaptar la elección del o de los grupos R_1 a R_6 . En el caso de utilización del método de la invención en que dos compuestos de fórmula (II) entran en competición en la etapa (2), el sustrato de fórmula (I) puede corresponder al sustrato específico no modificado de la enzima, lo cual representa una ventaja en el caso de la utilización del método de la invención para la identificación de nuevos catalizadores o de la actividad nueva de catalizadores conocidos susceptibles de transformar un sustrato de fórmula (I) o (I') respectivamente en un compuesto de fórmula (II) o (II').

El método de la invención permite identificar una transformación química enantio o estereoselectiva en una muestra.

Ventajosamente, la transformación química se efectúa por medio de un catalizador y, en especial, de una enzima. A modo de ejemplo no limitativo, el método de la invención permite la detección de la actividad de una enzima elegida entre: lipasa, esterasa, proteasa, glucosidasa, glucosiltransferasa, fosfatasa, cinasa, mono o dioxigenasa, haloperoxidasa, lignina peroxidasa, diarilpropano peroxidasa, epóxido hidrolasa, nitrilo hidratasa, nitrilasa, transaminasa, amidasa, acilasa, dihidroxilasa, fitasa, xilanasa, nucleasa y reductasa.

En el caso de una transformación química espontánea o no, se pueden citar en especial: una hidrólisis espontánea o térmica de un éster, una dihidroxilación de olefina por los reactivos AD-mix y una hidrólisis de los epóxidos por complejos de cromo.

La presente invención describe finalmente un procedimiento de detección y/o de cuantificación de una transformación química conocida, en una muestra, consistente en utilizar el método de detección de una transformación química descrita anteriormente en presencia de la mencionada muestra y de un sustrato adaptado a la actividad buscada.

La invención permite también detectar el sustrato de fórmula (I) o (I') en presencia de un reactivo catalizador químico o bioquímico.

El método de la invención puede utilizarse para el cribado, en especial a flujo alto, de un catalizador a partir de un banco de expresión *in vivo* o *in vitro*. Estos bancos pueden prepararse, por ejemplo, a partir de microorganismos o de microalgas que presenten preferentemente propiedades extremófilas.

El método de la invención también puede utilizarse para identificar catalizadores que presenten una actividad diferente con respecto a una actividad de partida. Estos catalizadores serán, por ejemplo, productos de mutagénesis dirigida o de evolución dirigida.

Una forma especial de utilización del método de la invención concierne al caso en que el sustrato de fórmula (I) o (I') es él mismo el producto de una primera transformación química desconocida, cuya actividad se quiere identificar.

A modo de ejemplo de esta forma especial de utilización del procedimiento de la invención, se puede citar la reacción de epoxidación de olefinas para transformarlas en epóxidos de fórmulas (I) o (I') o (VII), los mencionados epóxidos sufren después una reacción enzimática a fin de obtener los dioles de fórmulas (II) o (II') o (X), los cuales se someterán a una reacción de oxidación química por el perydato.

El método de la invención es remarcable por cuanto permite también la identificación y el aislamiento de nuevos catalizadores químicos o bioquímicos susceptibles de transformar un sustrato de fórmula (I) o (I') respectivamente en un compuesto de fórmula (II) o (II'). En efecto, el método de la invención permite revelar la presencia de un catalizador que, gracias a la oxidación química, genera una señal directamente o indirectamente detectable.

En consecuencia, la invención tiene también por objeto la utilización del método de detección de una transformación química, como se ha descrito anteriormente, para la identificación de nuevos catalizadores o de la actividad nueva de un catalizador conocido. La invención se aplica también a un catalizador susceptible de ser identificado por el método de la invención.

Estos nuevos catalizadores son específicos de las condiciones experimentales utilizadas durante su detección, corresponden ventajosamente a enzimas.

Estas nuevas enzimas son específicas de las condiciones experimentales utilizadas durante su detección.

Otras ventajas y características de la invención surgirán de la lectura de los ejemplos siguientes, que forman parte de los trabajos experimentales efectuados por el solicitante en el marco de la invención y en que se hace

referencia a las figuras en anexo, en las que

- La figura 3 representa la actividad enzimática de la lipasa de *Candida antarctica* en función de la temperatura. Las reacciones enzimáticas se han realizado en el tampón PIPES (0,1 M pH 7) a 50, 60, 70, 80 y 95 °C durante 40 minutos utilizando 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato. (■) lipasa de *Candida antarctica*; (□) sin enzima.

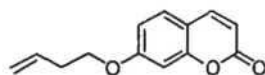
- La figura 4 ilustra la actividad enzimática de la lipasa de *Candida antarctica* en función de la temperatura. Las reacciones enzimáticas se han realizado en el tampón PIPES (0,1 M pH 7) a 50, 60, 70, 80 y 95 °C durante 40 minutos utilizando para -nitrofenilbutirato. (■) lipasa de *Candida antarctica*; (□) sin enzima.

- La figura 5 ilustra la actividad enzimática de la lipasa de *Candida antarctica* en función del pH de la solución. Las pruebas se han realizado utilizando 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato.

- La figura 6 ilustra la actividad enzimática de la lipasa de *Candida antarctica* en función del pH de la solución. Las pruebas se han realizado utilizando butirato de paranitrofenol.

I- Síntesis de los sustratos.

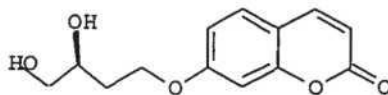
Ejemplo 1: Preparación de 4-(7-cumariniloxy)-1-buteno.



4-(7-cumariniloxy)-1-buteno.

Se trata una suspensión de 7-hidroxycumarina (3 g, 19,6 mmol) en DMF (20 ml) con NaH (60 % suspensión en aceite, 1,03 g, 25,9 mmol) y después con 4-bromo-1-buteno (2,65 g, 19,6 mmol). Se calienta a 60 °C durante 24 h, después se diluye con acetato de etilo (400 ml), se lava con agua (3 x 300 ml) y después con NaOH 1 M (3 x 200 ml). Se somete a cromatografía el residuo (acetato de etilhexano) para obtener 4-(7-cumariniloxy)-1-buteno (2,7 g, 67 %).

Ejemplo 2: Preparación de (S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol.



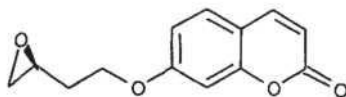
(S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol (2)

Se agita una suspensión de AD-mix-alfa (4,2 g) en 30 ml de t-BuOH/agua 1:1 hasta la obtención de una sola fase (5 min). Se enfría entonces a 0 °C y se añade la olefina (0,648 g, 3 mmol). Después de 16 h a 0 °C, se extingue con Na₂S₂O₅ (4,5 g). Después de una hora a temperatura ambiente, se extrae con CH₂Cl₂ y se somete a cromatografía (elución CH₂Cl₂/acetona 7:3) para obtener 0,6 g (80 %) de diol puro (S).

m.p. 92-93 °C, $[\alpha]_D^{20} = -22,4$ (c 0,46, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD) δ 7,83 (d, 1H, J = 9,8 Hz), 7,47 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 6,85-6,92 (m, 2H), 6,21 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 4,16-4,23 (m, 2H), 3,81-3,93 (m, 1H), 3,54 (d, 2H, J = 6,35 Hz), 1,97-2,13 (m, 1H), 1,74-1,91 (m, 1H).

El mismo procedimiento con AD-mix-beta da lugar al enantiómero R.

Ejemplo 3: Preparación de (S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-epoxibutano.



(S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-epoxibutano (7)

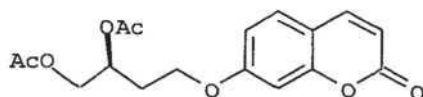
A una solución de (S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol (0,15 g, 0,6 mmol) en CH₂Cl₂, se añade ortoacetato de trimetilo (1 ml) y después sulfonato de piridinio paratolueno (1 mg). Después de 40 min, se evapora la totalidad y se disuelve el residuo en CH₂Cl₂ (1 ml) y se trata con Me₃SiCl (0,1 ml, 0,78 mmol). Después de una hora, se añade metanol seco (1 ml) y carbonato de potasio (0,2 g, 1,5 mmol). Se deja 2 h a 20 °C, después se filtra y se somete a cromatografía el filtrado (hexano/acetato de etilo 6:4) para obtener el epóxido (S) (0,097 g, rendimiento 70 %).

m.p. 61-64 °C, $[\alpha]_D^{20} = -23,0$ (c 0,3, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃) δ 7,58 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 7,31 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 6,75-6,81 (m, 2H), 6,18 (d, 1H, J = 9,8 Hz), 4,03-4,19 (m, 2H), 3,05-3,14 (m, 1H), 2,78 (t, 1H, J = 4,9 Hz), 2,53 (dd,

1H, $J = 4,9$ y $2,4$ Hz), 2,04-2,20 (m, 1H), 1,79-1,97 (m, 1H).

El mismo procedimiento con el (R)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol da lugar al enantiómero R.

Ejemplo 4: Preparación de (S)-1,2-diacetoxi-4-(7-cumariniloxy)-butano.



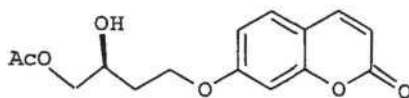
(S)-1,2-diacetoxi-4-(7-cumariniloxy)-butano

A una solución de (S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol (0,1 g, 0,4 mmol) en 4 ml de piridina anhidra a 0 °C, se añaden 2 ml de anhídrido acético. Después de 18 h a 20 °C, se evapora con tolueno y se somete a cromatografía el residuo para obtener el diacetato S (rendimiento cuantitativo).

m.p. 74-76 °C, $[\alpha]_D^{20} = -9,8$ (c 0,5, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7,61 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz), 7,34 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 6,74-6,82 (m, 2H), 6,22 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz), 5,24-5,35 (m, 1H), 4,32 (dd, 1H, $J = 11,7$ y $3,4$ Hz), 3,97-4,15 (m, 2H), 4,10 (dd, 1H, $J = 11,7$ y $5,9$ Hz), 2,05-2,16 (m, 2H), 2,05 (s, 6H).

El mismo procedimiento con el (R)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol da lugar al enantiómero R.

Ejemplo 5: Preparación de (S)-1-acetoxi-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol.



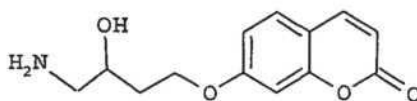
(S)-1-acetoxi-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol

A una solución de (S)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol (0,090 g, 0,36 mmol) y de trietilamina (0,1 ml, 0,72 mmol) en 8 ml de CH_2Cl_2 seco, se añade cloruro de acetilo (0,36 mmol, 0,024 ml). Después de 40 min a 0 °C, se diluye con CH_2Cl_2 y se lava con una solución acuosa de NaHCO_3 . La cromatografía del residuo después de evaporación da lugar al monoacetato S (0,058 g, 0,22 mmol, 60 %).

$[\alpha]_D^{20} = -9,6$ (c 0,31, CHCl_3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7,61 (d, 1H, $J = 9,8$ Hz), 7,33 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz), 6,78-6,83 (m, 2H), 6,21 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz), 4,01-4,29 (m, 5H), 2,09 (s, 3H), 1,91-2,00 (m, 2H).

El mismo procedimiento con el (R)-4-(7-cumariniloxy)-1,2-butanodiol da lugar al enantiómero R.

Ejemplo 6: Preparación de 1-amino-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol.

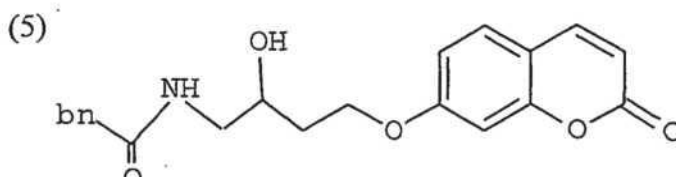


1-amino-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol

A una solución de 4-(7-cumariniloxy)-1,2-epoxibutano racémico (0,150 g, 0,65 mmol) en 2 ml de etanol, se añaden 5 ml de amoníaco 30 % acuoso y $\text{Gd}(\text{OTf}_3)$ (0,039 g, 0,065 mmol). Se calienta a 65 °C durante 15 h, se evapora el disolvente, se diluye el residuo en acetato de etilo y se lava con una solución saturada en NaCl. El residuo da lugar a la amina bruta (0,081 g, rendimiento 50 %) que se utiliza sin purificación para la etapa siguiente.

Ejemplo 7: Preparación de 1-fenilacetamido-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol.

A una solución de 1-amino-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol (0,162 g, 0,65 mmol) en 3 ml de CH_2Cl_2 seco a 0 °C, se añade trietilamina (1,3 mmol, 0,18 ml) y después cloruro de fenotipo (0,65 mmol, 0,085 ml). Se agita a 0 °C durante 2 h, después se diluye con CH_2Cl_2 y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 . Se somete a cromatografía el producto bruto para obtener la amida (0,170 g, 0,48 mmol, 74 %).



1-fenilacetamido-4-(7-cumariniloxy)-2-butanol

Ejemplo 8: Preparación de 6-metoxi-2-naftaldehído y 6-dimetilamino-2-naftaldehído.



6-metoxi-2-naftaldehído y 6-dimetilamino-2-naftaldehído.

Se prepara el 6-metoxi-2-naftaldehído por tratamiento sucesivo del 2-bromo-6-metoxinaftaleno en solución en éter seco con n-butil-litio y después dimetilformamida. (Literatura: *J. Med. Chem.* 1998, 1308-1312). El 6-dimetilamino-2-naftaldehído se prepara según el procedimiento descrito (Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 15351) como sigue: se introduce dimetilamina gaseosa en una mezcla de 2,4 ml de benceno seco y 2,4 ml de hexametilfosforamida (HMPA) hasta la disolución de 750 mg (16,7 mmol). A 0 °C y bajo atmósfera inerte, se añade n-butil-litio (1,6 M en el hexano, 16,7 mmol) y, después de 15 minutos, 6-metoxi-naftaldehído (390 mg, 2,09 mmol). Se deja en agitación durante 14 horas a 20 °C, después se vierte en tampón fosfato acuoso pH 7,4 y se extrae con éter. La purificación por cromatografía da lugar a 6-dimetilamino-2-naftaldehído (350 mg, 84 %).

6-metoxi-2-naftaldehído: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 10,09 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 7,78-7,95 (m, 3H), 7,17-7,26 (m, 2H), 3,96 (s, 3H).

Ejemplo 9: Preparación de 6-metoxi y 6-dimetilamino-2-vinilnaftaleno.



6-metoxi y 6-dimetilamino-2-vinilnaftaleno.

A una solución de iluro instantánea ($\text{Ph}_3\text{P}^+\text{Br}^- + \text{NaNH}_2$ 1,48 g, 2,4 mmol) en THF anhidro (5 ml), se añade 6-metoxi-naftaldehído (432 mg, 2,35 mmol). Después de una hora en agitación a temperatura ambiente, se diluye con éter, se filtra en Celite y se somete a cromatografía (hexano/AcOEt 5:1) para obtener 6-metoxi-2-vinil-naftaleno (390 mg, 90 %).

6-metoxi-2-vinil-naftaldehído: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7,59-7,74 (m, 4H), 7,11-7,16 (m, 2H), 6,86 (dd, 1H, $J = 17,3$ y 10,9 Hz), 5,82 (d, 1H, $J = 17,6$ Hz), 5,28 (d, 1H, $J = 10,7$ Hz), 3,93 (s, 3H).

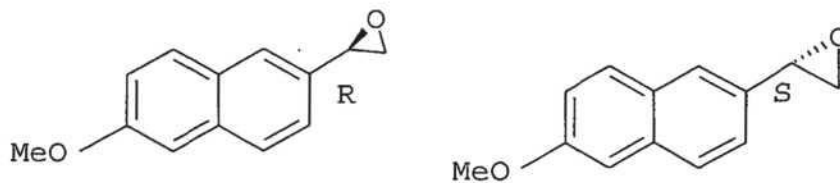
Ejemplo 10: Preparación de (R) y de (S) 6-metoxi-2-(1',2'-dihidroxietil)naftaleno.



(R) y (S) 6-metoxi-2-(1',2'-dihidroxietil)naftaleno.

Estos productos, en forma de enantiómeros R (>99 % ee) y S (>99 % ee), se han preparado por dihidroxilación asimétrica de Shamisens de la olefina correspondiente como se describe anteriormente para los derivados de la cumarina.

Diol: $^1\text{H-NMR}$ (acetona- d_6): 7,71-7,84 (m, 3H), 7,52 (dd, 1H, $J = 8,5$ y 1,5 Hz), 7,25-7,31 (m, 1H), 7,16 (dd, 1H, $J = 8,9$ y 2,5), 4,87 (dd, 1H, $J = 7,5$ y 4,2 Hz), 3,94 (s, 3H), 3,50-3,80 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{O} + 2 \text{ OH}$).

Ejemplo 11: Preparación de (R)- y de (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)oxirano.

(R)- y (S)-2-(6-metoxi-2-naftil)oxirano.

Estos productos se han preparado a partir de los dioles correspondientes según el método descrito anteriormente para los derivados de la cumarina y se han obtenido ópticamente puros (ee >99 % según HPLC quiral)

^1H NMR (CDCl_3): 7,70-7,75 (m, 3H), 7,26-7,32 (m, 1H), 7,13-7,19 (m, 2H), 4,00 (dd, 1H, $J = 4,1$ y $2,4$ Hz), 3,92 (s, 3H), 3,22 (dd, 1H, $J = 5,4$ y $4,0$ Hz), 2,91 (dd, 1H, $J = 5,4$ y $2,4$ Hz).

II - Oxidación por peryodato.

La oxidación de 1,2 dioles y de aminoalcoholes por peryodato en un medio acuoso es una reacción bien conocida por el especialista. Esta reacción aporta una alternativa puramente química para la conversión de alcoholes en grupos carbonilos en medio acuoso con una quimioselectividad elevada en presencia de otros grupos funcionales. El solicitante ha observado ahora que, ventajosamente, las enzimas hidrolíticas que liberan dioles o aminoalcoholes a partir de sustratos resistentes a la oxidación por peryodato son detectables por fluorescencia en presencia de peryodato y de albúmina de suero bovino (BSA).

Los diésteres (R)- (S)-, así como los monoésteres (R)- y (S)- representados por la fórmula (I) (compuestos 1 a/b, 3 a/b), constituyen excelentes sustratos para las lipasas y las esterasas, dada su similitud estructural con los glicéridos. Las amidas representadas por la fórmula I (compuesto 5) reaccionan con las amidasas y las peptidasas. Los epóxidos (R)- y (S)- representados por la fórmula (II) (compuestos 7 y 8) reaccionan con las enzimas epoxihidrolasas. Así, el solicitante ha observado que la transformación sufrida por estos sustratos fluorogénicos transformados por el peryodato de sodio, en presencia de las enzimas hidrolíticas, aporta un nuevo método de detección de las mencionadas enzimas.

III - Estabilidad de los sustratos.

Los sustratos acetatos 1, la amida 5 y el epóxido 6 son estables en presencia de peryodato y de BSA sin los medios acuosos. En las mismas condiciones, el diol 2 y el aminoalcohol 6 liberan umbeliferona. En condiciones de reacción optimizadas utilizando 100 μm de sustrato, 1 mM de peryodato de sodio, 2 mg/ml de BSA en un tampón borato a pH 8,8, el diol 2 se transforma en umbeliferona con un rendimiento del 72 % sin reacciones secundarias observables. El rendimiento de la oxidación es independiente de la presencia de BSA, lo cual indica que estos reactivos no interfieren de manera notoria entre sí. La oxidación del aminoalcohol 6 se produce con un rendimiento del 85 % en las mismas condiciones.

IV - Desarrollo del ensayo.

Los acetatos 1, la amida 5 y los epóxidos (R)-7 y (S)-7 se han probado en presencia de las enzimas hidrolíticas correspondientes. Los acetatos se han probado frente a 25 esterasas y lipasas diferentes. Los epóxidos se han probado frente a la epoxihidrolasa extraída de *Aspergillus niger* (X. J. Chen, A. Archelas, R. Furstoss, J. Org. Chem. 1993, 58, 5528) y de *Rhodotorula glutinis* (C. A. G. M. Weijers, A. L. Botes, M. S. van Dyk, J. A. M. de Bont, Tetrahedron Asymm. 1998, 9, 467).

La fenilacetamida 5 se ha probado frente a la penicilina G acilasa, la quimitripsina y la papaína. Se ha observado un aumento de la fluorescencia claramente dependiente del tiempo cuando la actividad enzimática está presente. Los análisis efectuados por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) confirman que el aumento de la fluorescencia está provocado por la liberación de la umbeliferona de los sustratos.

En todos los casos, los resultados obtenidos son similares tanto a pH 7,2 como a pH 8,8.

Todas las enzimas que han mostrado una actividad frente a un sustrato cualquiera conservan su actividad tanto efectuando una preincubación de la enzima con el sustrato, antes de la adición del peryodato y de la BSA o durante la reacción, en presencia de todos los componentes. Esto demuestra claramente que la adición del peryodato y de la BSA como agentes secundarios no afecta a la actividad enzimática de las enzimas que deben ser analizadas. Los análisis por HPLC de la reacción con las enzimas activas en ausencia de peryodato y de BSA muestran que el diol 2

y el aminoalcohol 6 son realmente liberados por las enzimas que se han considerado activas en la prueba de fluorescencia.

V - Medida de la actividad lipasa utilizando los sustratos 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y p-nitro-fenilbutirato

La actividad hidrolítica de la lipasa de *Candida antarctica* se ha probado en 2 sustratos: 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y p-nitro-fenilbutirato.

La actividad lipásica se detecta después de hidrólisis de las funciones ésteres de los sustratos que conducen a la liberación (directa o indirecta) de paranitrofenol de color amarillo que se mide por colorimetría a 414 nm. Las pruebas se han realizado a diferentes temperaturas y pH.

Las soluciones madres de 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y de paranitrofenolbutirato (SIGMA) se preparan a la concentración de 20 mM en, respectivamente, acetonitrilo e isopropanol. La concentración de lipasa B utilizada es de 0,01 mg/ml en un tampón fosfato (100 mM pH 7).

V.1 - Medida de la actividad lipasa en función de la temperatura

V.1.1 - Determinación de la actividad lipasa con 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato.

A 13,6 μmol de 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato, se añaden 74 μl de tampón PIPES (100 mM pH 7) y 10 μl de una solución de lipasa a 0,01 mg/ml. La reacción se deja al baño maría durante 40 minutos a 50, 60, 70, 80 y 95 °C. A continuación, se retiran las muestras del baño maría. Después se añaden 40 μl de NaIO_4 (100 mM) y 4 μl de BSA (50 mg/ml) a la mezcla. El pH de la solución se ajusta después a pH 10 añadiendo 40 μl de una solución de Na_2CO_3 a 0,2 M. El paranitrofenol liberado se mide a continuación por colorimetría a 414 nm.

Se ha realizado un control negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

V.1.2 - Determinación de la actividad lipasa con p-nitrofenilbutirato

A 13,6 μmol de paranitrofenilbutirato, se añaden 74 μl de tampón PIPES (100 mM pH 7) y 10 μl de una solución de lipasa a 0,01 mg/ml. La reacción se deja al baño maría durante 40 minutos a 50, 60, 70, 80 y 95 °C. Después se retiran las muestras del baño maría y el pH de la solución se ajusta a pH 10 con una solución de Na_2CO_3 0,2 M. Después se mide el paranitrofenol liberado por colorimetría a 414 nm.

Se ha realizado un control negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

V.2. - Medida de la actividad lipasa en función del pH de la solución

La actividad enzimática de la lipasa de *Candida antarctica* se ha realizado a diferentes pH utilizando los tampones (100 mM) listados en la tabla VII siguiente.

Tabla VII

Tampón	pH
Formato	3
Formato	4
Acetato	5
MES	6,5
PIPES	7
Fosfato	8

V.2.1 - Determinación de la actividad lipasa con 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato

A 13,6 μmol de 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato, se añaden 74 μl de tampón al pH deseado (100 mM) y 10 μl de una solución de lipasa a 0,01 mg/ml. La reacción se deja al baño maría durante 40 minutos a 60 °C. A continuación, se retiran las muestras del baño maría. Después se añaden 40 μl de NaIO_4 (100 mM) y 4 μl de BSA (50 mg/ml) a la mezcla. El pH de la solución se ajusta a continuación a pH 10 añadiendo 40 μl de una solución de Na_2CO_3 a 0,2 M. El paranitrofenol liberado se mide después por colorimetría a 414 nm.

Se ha realizado un testigo negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

V.2.2 Determinación de la actividad lipasa con p-nitrofenilbutirato

A 13,6 μmol de paranitrofenilbutirato, se añaden 74 μl de tampón al pH deseado (100 mM) y 10 μl de una solución de lipasa a 0,01 mg/ml. La reacción se deja al baño maría durante 40 minutos a 60 °C. A continuación, se retiran las muestras del baño maría y el pH de la solución se ajusta a pH 10 con una solución de Na_2CO_3 0,2 M. Después se mide el paranitrofenol liberado por colorimetría a 414 nm.

Se ha realizado un testigo negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

V.3 - Resultados de la detección de la actividad lipasa.

El 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y el sustrato comercial paranitrofenilbutirato se han probado frente a la lipasa de *Candida antarctica*. Se observa la aparición de la coloración amarilla relacionada con la liberación de paranitrofenol cuando está presente la actividad hidrolítica.

Se ha medido la actividad de la lipasa en función de la temperatura de incubación utilizando 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y el sustrato comercial paranitrofenilbutirato. La tabla VIII muestra las mediciones de la actividad de la lipasa de *Candida antarctica* efectuadas utilizando 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y paranitrofenilbutirato. Las actividades se expresan en %. Las reacciones enzimáticas se han realizado en el tampón PIPES (0,1 M pH 7) a 50, 60, 70, 80 y 95 °C durante 40 minutos. También se ha realizado un control negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

Tabla VIII

	2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil- decanoato		p- nitrofenilbutirato	
Temperatura (°C)	Lipasa B	Sin enzima	Lipasa B	Sin enzima
50	100	8,7	100	83,6
60	75,9	9,4	75,4	67,3
70	61,5	9,5	60,4	59,5
80	44,2	8,1	55,9	59,8
95	26,1	8,6	66,7	71,5

También se ha determinado la actividad hidrolítica de la lipasa en función del pH de la solución. La tabla IX siguiente muestra la actividad de la lipasa de *Candida antarctica* medida utilizando 2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato y paranitrofenilbutirato. Las actividades se expresan en %. Las reacciones enzimáticas se han incubado a 60 °C durante 40 minutos a pH 3, 4, 5, 6,5, 7 y 8. También se ha realizado un control negativo sin enzima en las mismas condiciones experimentales.

Tabla IX

	2-hidroxi-4-p-nitrofenil-butil-decanoato		p-nitrofenilbutirato	
pH	Lipasa B	Sin enzima	Lipasa B	Sin enzima
3	58,9	3,9	94,2	54,9
4	80,9	2,7	73	63,6
5	96,1	2,6	100	65,6
6,5	100	2,9	79,5	69,2
7	72	3,4	60,8	51,4
8	40	2,8	103,9	103,9

VI. Detección de la liberación de un compuesto volátil.

Las primeras pruebas se han realizado con tres sustratos diferentes: el benzaldehído, la forma volátil, la hidrobenzoína y el 1,2-pentanodiol, las formas vecinales.

Se mezclan 10 mg de cada producto con 10 mg de NaIO₄ y 1 g de MgSO₄ y después se dejan simplemente al aire en un estante.

Se realiza la detección de los aromas de vez en cuando extrayendo un poco de polvo y añadiendo agua. Los resultados correspondientes a las observaciones relativas a la percepción de los perfumes se resumen en la tabla X siguiente

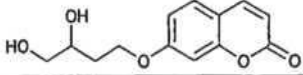
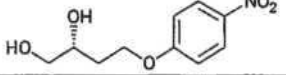
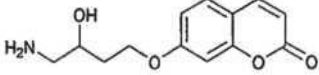
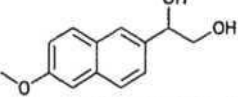
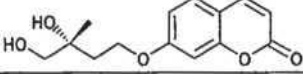
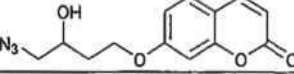
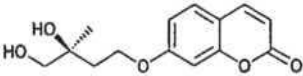
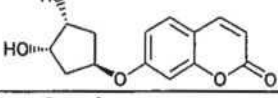
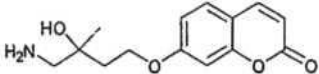
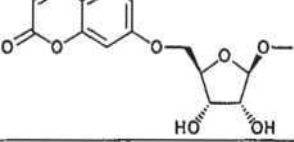
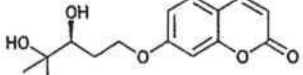
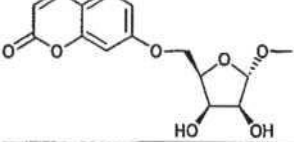
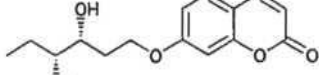
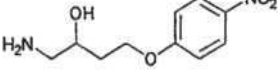
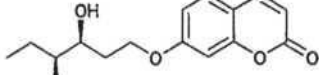
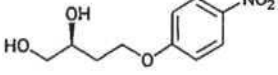
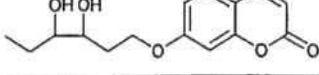
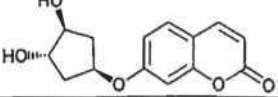
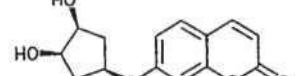
Tabla X

Duración	Benzaldehído	Hidrobenczoína	1,2-pentanodiol
1 día	olor fuerte	una simple agitación del sólido con ultrasonidos basta para liberar un olor perceptible	una simple agitación del sólido con ultrasonidos basta para liberar un olor perceptible
5 días	más olor	deben añadirse 2 o 3 gotas de agua a unos miligramos de sólido	deben añadirse 2 o 3 gotas de agua a unos miligramos de sólido
1 mes	ídem	deben añadirse 2 o 3 ml de agua a unos miligramos de sólido	deben añadirse 2 o 3 ml de agua a unos miligramos de sólido
5 meses	ídem	ídem	Es necesaria una mayor cantidad de sólido

La detección del olor a «almendra» del benzaldehído, la forma volátil, es estable al menos un día. En cambio, gracias al procedimiento de la invención, la oxidación de los dioles vecinales correspondiente al benzaldehído permite difundir durante varios meses el olor a «almendra» del benzaldehído.

Anexo

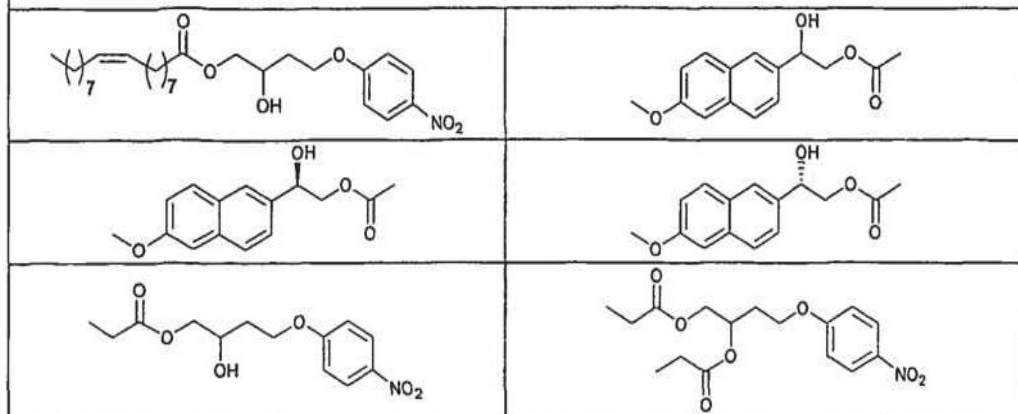
Tabla XI
Lista de los sustratos con grupos funcionales
Dioles, aminoalcoholes y acidoalcoholes

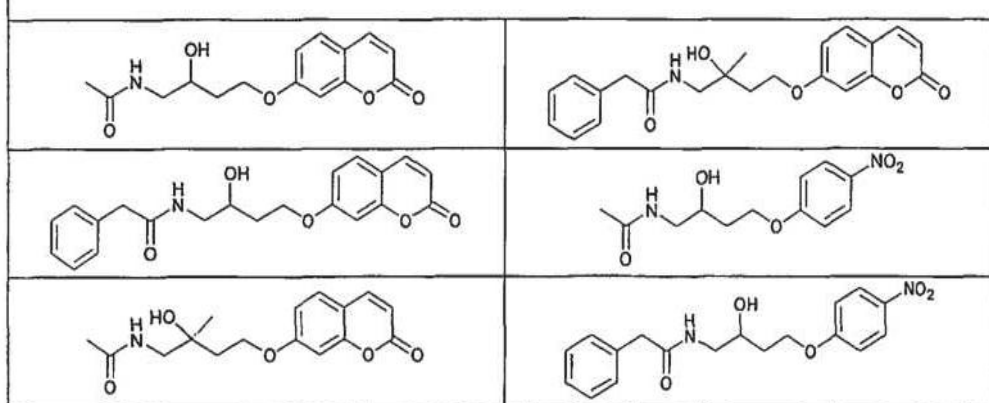
Ésteres	

Esteres	

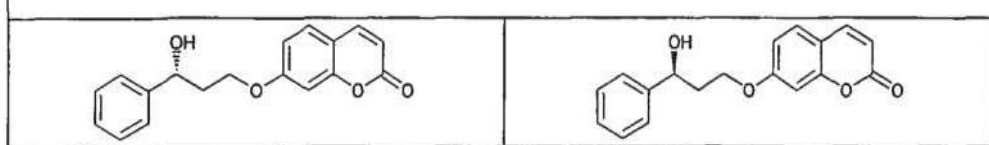
Esteres



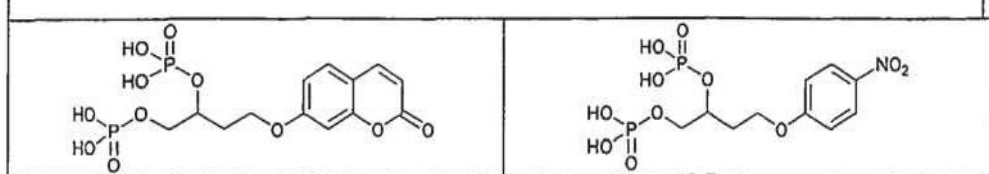
Amidas



Alcoholes

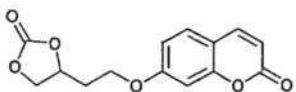
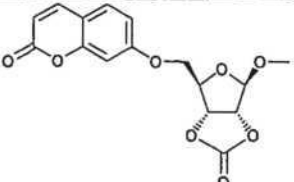
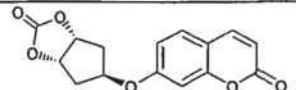
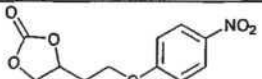
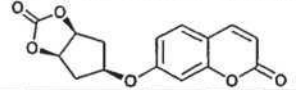
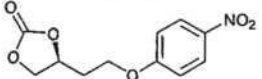
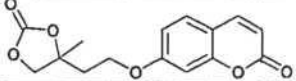
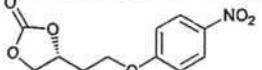
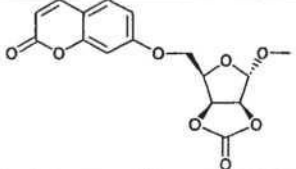


Fosfatos



Tiroles y derivados	

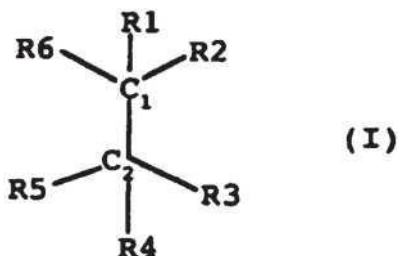
Epóxidos	

5		
10		
15		
20		
25		

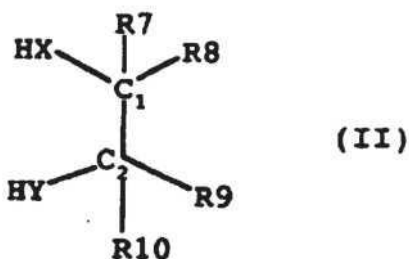
REIVINDICACIONES

1) Método de detección de la transformación química y/o enzimática de un sustrato en un compuesto detectable, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:

a) la transformación química de un sustrato de fórmula (I) en la que el enlace C1-C2 es insensible a una ruptura por una reacción de oxidación química:



en un compuesto de fórmula (II) en la que el enlace C1-C2 es sensible a una ruptura por una reacción de oxidación química efectuada por medio de un agente químico oxidante:



y,

(b) la oxidación química del compuesto de fórmula (II) obtenido en la etapa (a) que rompe el enlace C1-C2 para obtener directamente o indirectamente un producto detectable,

y porque, en los compuestos de fórmulas (I) y (II):

- al menos uno de los grupos R1 a R6 es un grupo Di que es insensible a la reacción de oxidación de la etapa (b) y que presenta propiedades detectables después de la ruptura del enlace C1-C2,
- los grupos R1 a R6, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, un grupo funcional sustituido o no y, en el caso de un grupo funcional de fórmulas -OR12, -SR12, -NR11R12, R11 se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R12 no es un átomo de hidrógeno,
- el o los grupos R1 a R6 que forman después de la etapa (a) los grupos de fórmulas -XH y -YH son insensibles a la oxidación de la etapa (b),
- X e Y, idénticos o diferentes, se eligen entre un átomo de oxígeno, un átomo de azufre y una amina de fórmula -NR11R12, R11 se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R12 no es un átomo de hidrógeno,
- R7 a R10, idénticos o diferentes, o bien idénticos a cuatro como máximo de los grupos R1 a R6, o bien, debido a la transformación de uno o varios de los grupos R1 a R6, durante la reacción de la etapa (a), se eligen entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no, y al menos uno de los grupos R7 a R10 es un grupo Di.

2) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el agente químico oxidante se elige entre H5IO6, RuO2, OsO4, (CH3CH2CH2)4N(RuO4), NaClO4, NaIO4, Na3H2IO6, NaMnO4, K2OsO4, KIO4, KMnO4, KRuO4, K2RuO4, LiOCl, el acetato de plomo, el peryodato de tetrapropilamonio, el ácido crómico o sus sales, NaBiO3, Ph3BiO3, Ca(OCl)2, los reactivos Ce(IV), Cr(VI), las sales de Co (II), IOAc, I(OAc)3, N-yodosuccinimida, VO(acac), Pb(OAc)4, MnO2, H2O2 o la mezcla de los reactivos [H2O2, Na2WO4, H3PO4].

3) Método según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el agente químico oxidante es una sal peryodato.

4) Método según una de las reivindicaciones 1, **caracterizado porque** R1 a R6 se eligen de manera que el enlace C1-C2 forme parte al menos de un ciclo.

5) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** al menos un par de los grupos R1 a R6 forman juntos un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo de fórmula -NR11R12, donde R11 se elige entre un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo y un grupo arilo, sustituidos o no, y R12 no es un átomo de hidrógeno.

6) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** como máximo un par de grupos R1 a R6, uno de los cuales se elige entre R1 y el otro se elige entre R3, R4 y R5, forman un doble enlace entre los carbonos C1 y C2.

7) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** como máximo dos pares de grupos R1 a R6, uno de los cuales se elige entre R1, R2 y R6, y el otro se elige respectivamente entre R3, R4 y R5, forman un triple enlace.

8) Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** los grupos R1 a R6 son sensibles o insensibles a la oxidación de la etapa (b) y porque las etapas (a) y (b) no son simultáneas.

9) Método según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el o los grupos R1 a R6 son insensibles a la oxidación de la etapa (b) y porque las etapas (a) y (b) son simultáneas.

10) Método según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** la transformación química es una reacción catalítica.

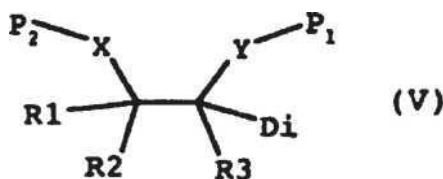
11) Método según la reivindicación 10, **caracterizado porque** la transformación química es una reacción enzimática.

12) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** los grupos R1 a R10 o R'1 a R'10 son estables en un medio reactivo, elegido entre un medio acuoso, un medio orgánico o un medio bifásico o un medio sólido.

13) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** una o la otra o las dos etapas (a) y (b) se realizan en un medio reactivo elegido entre un medio acuoso, un medio orgánico, un medio bifásico o un medio sólido.

14) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el sustrato comprende uno o varios centros quirales.

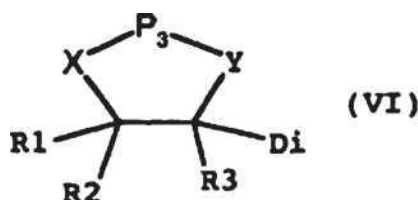
15) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el sustrato responde a la fórmula (V) siguiente:



en la que:

- Di, R1, R2, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1 y
- Como máximo uno de los grupos P1 y P2 es un átomo de hidrógeno o P1, P2, idénticos o diferentes, se eligen entre un grupo acilo sustituido por un grupo arilo o alquilo o peptidilo, un grupo fosfato, un grupo éster fosfato, un grupo fosfonato, un grupo carbamilo sustituido por un grupo arilo o acilo o peptidilo, un grupo glucosilo y un grupo sulfato.

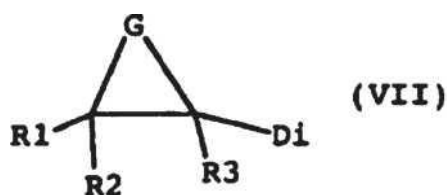
16) Método según la reivindicación 1 o 4, **caracterizado porque** el sustrato responde a la fórmula (VI) siguiente:



en la que:

- Di, R1, R2, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1, y
- P3 se elige entre un grupo carbonilo, un grupo -PO2R11 o un grupo -OR11PO-, en que R11 presenta la misma significación que en la reivindicación 1, un grupo -SO2, un grupo -CHOR13 en que R13 representa un grupo arilo, alquilo o glucosilo, un grupo SiR14R15 en que R14 y R15, idénticos o diferentes, representan un grupo arilo, alquilo, ariloxi o alcoxi y un grupo AsO2H-.

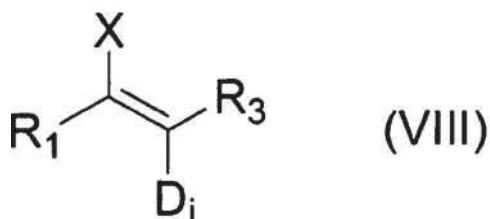
17) Método según una de las reivindicaciones 1 o 5, **caracterizado porque** el sustrato responde a la fórmula (VII) siguiente:



en la que:

- Di, R1, R2 y R3 tienen la misma significación que en la reivindicación 1 y,
- G representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo amino de fórmula NR₁₁R₁₂ en que R₁₁ y R₁₂ tienen la misma significación que en la reivindicación 1.

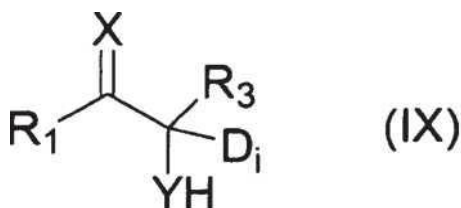
18) Método según la reivindicación 1 o 6, **caracterizado porque** el sustrato responde a la fórmula (VIII) siguiente:



en la que:

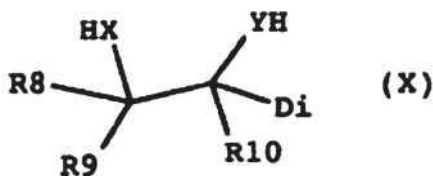
- Di, R1, R2 y R3 tienen las mismas significaciones que en la reivindicación 1.

19) Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el sustrato responde a la fórmula (IX) siguiente:



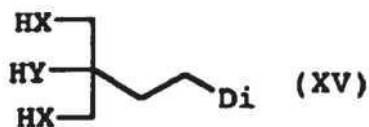
en la que Di, R1, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1.

20) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** el producto procedente de la transformación de la etapa (a) del sustrato responde a la fórmula (X) siguiente:



en la que, Di, R8, R9, R10, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1.

21) Método según una de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado porque** el producto procedente de la transformación de la etapa (a) responde a la fórmula (XV) siguiente:



en la que X, Y y Di tienen la misma significación que en la reivindicación 1 y en la que la cadena que contiene Di está unida a una cualquiera de las posiciones 1, 2 o 3 del derivado glicerolado.

22) Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la reacción de oxidación se realiza en medio orgánico.

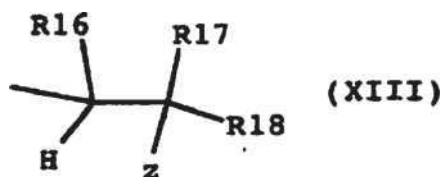
23) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, **caracterizado porque** la oxidación química del compuesto de fórmula (II) conduce al producto directamente detectable de fórmula (XI) siguiente:



en la que Di, R9 e Y tienen las mismas significaciones que en las reivindicaciones anteriores.

24) Método según la reivindicación 23, **caracterizado porque** el producto de fórmula (XI) se elige entre el grupo que comprende una cetona aromática, un aldehído o una feromona.

25) Método según la reivindicación 20 o 24, **caracterizado porque** el grupo Di del producto de la fórmula (II) o de la fórmula (X) responde a la fórmula (XIII) siguiente:



en la que:

- R16, R17 y R18, idénticos o diferentes, representan o bien un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sustituido o no, o un grupo funcional sustituido o no,
- Z es un precursor de un producto detectable ZH.

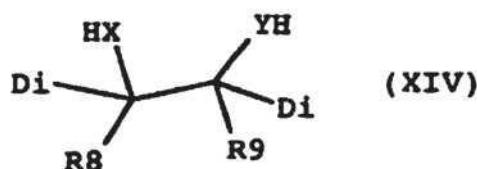
26) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado porque** la oxidación química del compuesto de fórmula (II) es seguida por una reacción de beta-eliminación y conduce al producto detectable de fórmula ZH.

27) Método según la reivindicación 25, **caracterizado porque** el producto detectable ZH se elige entre un derivado de un alcohol aromático, un alcohol heteroaromático, una amina heteroaromática, un átomo de halógeno o un éster fosfórico.

28) Método según la reivindicación 26, **caracterizado porque** ZH se elige entre la fluoresceína, la fenoltaleína, el rojo de fenol, el p-nitrofenol, el o-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el ácido 6-hidroxinaftoico, el ácido 8-hidroxipireno 1,3,6-trisulfónico, la tirosina, la luciferina, el 5-bromo-4-cloro-indolilo, el indolilo, el quinolinio, el nitroanilino o la piridoxamina.

29) Método según una de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado porque:

- el compuesto procedente de la transformación del sustrato después de la etapa (a) responde a la fórmula (XIV) siguiente:



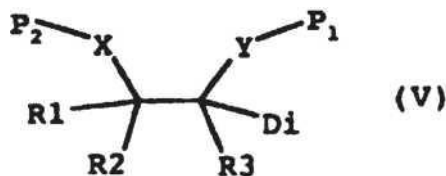
en la que Di, R8, R9, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1, y porque:

- comprende un par de grupos detectables Di idénticos o diferentes, uno unido al carbono C1 y el segundo unido al carbono C2, y
- los dos grupos detectables Di interactúan entre sí.

30) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, **caracterizado porque** el grado de especificidad del sustrato es aportado por la estructura del o de los grupos R1 a R6 de la fórmula (I).

31) Método de detección de una transformación química de un sustrato, **caracterizado porque** se somete al mencionado sustrato a un método de liberación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30 y porque se detecta el producto liberado.

32) Utilización de un compuesto de fórmula (V) siguiente:

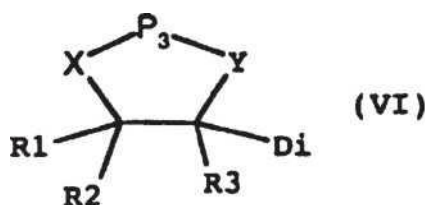


en la que:

- Di, R1, R2, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1 y
- como máximo uno de los grupos P1 y P2 es un átomo de hidrógeno o P1, P2, idénticos o diferentes, se eligen entre un grupo acilo sustituido por un grupo arilo o alquilo o peptídico, un grupo fosfato, un grupo éster fosfato, un grupo fosfonato, un grupo carbamilo sustituido por un grupo arilo o alquilo o peptídico, un grupo glucosilo y un grupo sulfato,

como sustrato para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 15 y 20 a 31.

33) Utilización de un compuesto de fórmula (VI) siguiente:



en la que:

- Di, R1, R2, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1, y
- P3 se elige entre un grupo carbonilo, un grupo -PO2R11 o un grupo R11PO-, en que R11 presenta la misma significación que en la reivindicación 1, un grupo -SO2, un grupo -CHOR13 en que R13 representa un grupo arilo, alquilo o glucosilo, un grupo SiR14R15 en que R14 y R15, idénticos o diferentes, representan un grupo arilo, alquilo, ariloxi o alcoxi y un grupo AsO2H-,

como sustrato para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14, 16 y 20 a 31.

34) Utilización de un compuesto de fórmula (VII) siguiente:

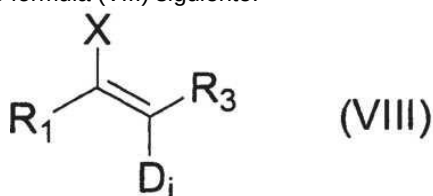


en la que:

- Di, R1, R2 y R3 tienen la misma significación que en la reivindicación 1 y,
- G representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre o un grupo amino de fórmula NR11R12 en que R11 R12 tienen la misma significación que en la reivindicación 1,

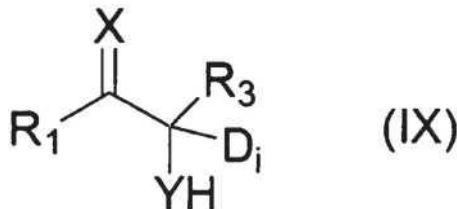
como sustrato para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14, 17 y 20 a 31.

35) Utilización de un compuesto de fórmula (VIII) siguiente:



en la que Di, R1, R2 y R3, tienen la misma significación que en la reivindicación 1, como sustrato para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14, 18 y 20 a 21.

36) Utilización de un compuesto de fórmula (IX) siguiente:



en la que Di, R1, R3, X e Y tienen la misma significación que en la reivindicación 1, como sustrato para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14 y 19 a 31.

37) Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, **caracterizada porque** los grupos R1 a R3 son estables en un medio reactivo, en especial acuoso, orgánico, bifásico o sólido.

38) Utilización de un método de detección de una transformación química según la reivindicación 31 para la identificación de nuevos catalizadores o de la actividad nueva de catalizadores conocidos susceptibles de transformar un sustrato de fórmula (I) respectivamente en un compuesto de fórmula (II).

39) Utilización de un método de detección de una transformación química según la reivindicación 31 para la detección del mencionado sustrato de fórmula (I) producido durante una reacción química.

40) Utilización según la reivindicación 38, **caracterizada porque** el catalizador está contenido en una muestra biológica y porque se añade a la mencionada muestra un sustrato de fórmula (I).

FIGURA 1

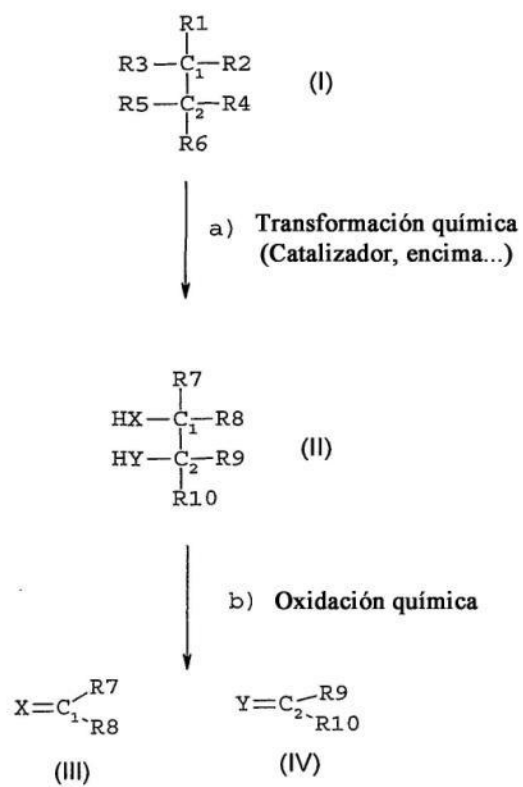


Figura 2



Figura 3

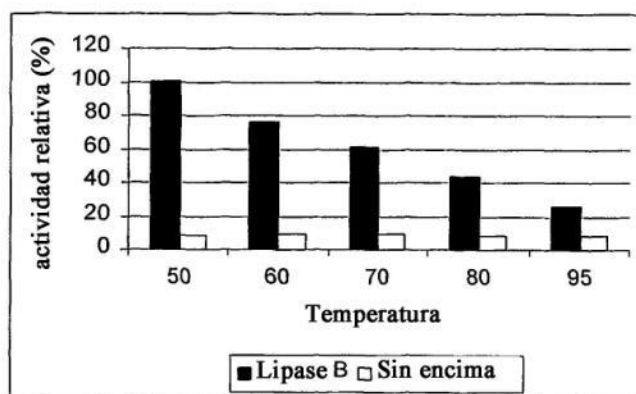


Figura 4

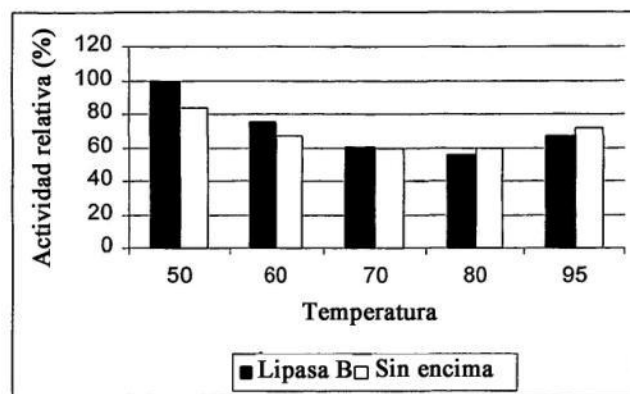


Figura 5

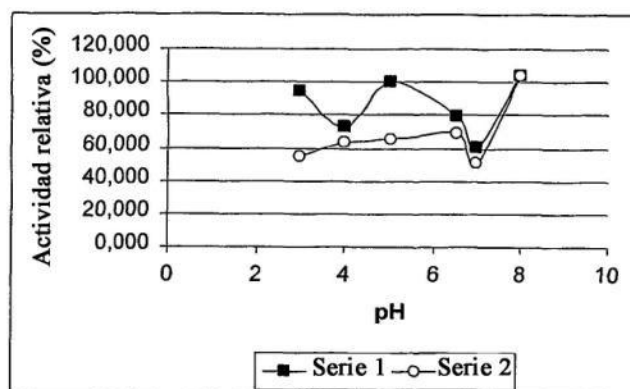


Figura 6

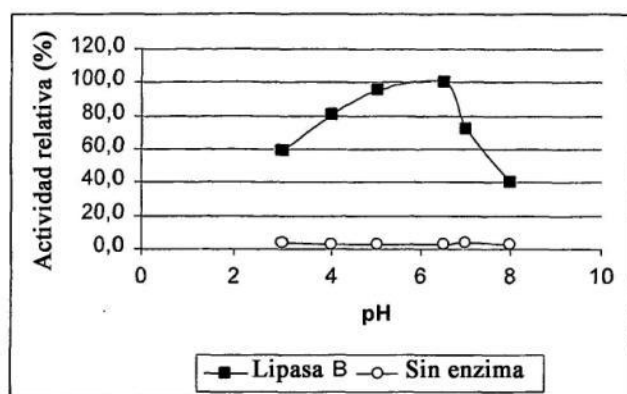


Figura 7

