

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 943**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/14** (2006.01)

**C07K 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2006 E 06010463 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1734047**

54 Título: **Uso de líquidos iónicos para la extracción de proteínas**

30 Prioridad:

**13.06.2005 DE 102005027172**

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

**08.08.2014**

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)  
FRANKFURTER STRASSE 250  
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**VON HAGEN, JÖRG, DR. y  
MICHELSEN, UWE, DR.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 483 943 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

Uso de líquidos iónicos para la extracción de proteínas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos de muestras biológicas, empleándose como agente de extracción líquidos iónicos de fórmula general  $K^+A^-$ .

10 La determinación referente al análisis de proteínas ha obtenido una importancia creciente en medicina. Esto se refiere en particular al análisis de muestras de tejido para detectar indicios de una enfermedad o una alteración patológica. Con este fin se investigan análisis del proteoma total de la célula. Para ello, es esencial extraer cuantitativamente todas las proteínas de una muestra dada, ya que sólo el análisis de todas las proteínas implicadas en su totalidad permite sacar conclusiones sobre las enfermedades y su origen.

15 Por consiguiente, el objetivo consistió en proporcionar procedimientos mediante los cuales se puedan extraer proteínas de muestras biológicas para después poder analizarlas.

20 Por consiguiente, son objeto de la presente invención procedimientos para la extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos de muestras biológicas, empleándose como agente de extracción líquidos iónicos de fórmula general  $K^+A^-$ .

25 Los líquidos iónicos o sales líquidas son especies iónicas que se componen de un catión orgánico y un anión, por lo general, inorgánico. No contienen moléculas neutras y presentan en su mayoría puntos de fusión inferiores a 373 K.

30 Actualmente, el tema de los líquidos iónicos se investiga de un modo intensivo, ya que las posibilidades de aplicación son diversas. Son artículos de resumen sobre los líquidos iónicos, por ejemplo, R. Sheldon "Catalytic reactions in ionic liquids", *Chem. Commun.*, 2001, 2399-2407; M.J. Earle, K.R. Seddon "Ionic liquids. Green solvent for the future", *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000), 1391-1398; P. Wasserscheid, W. Keim "Ionische Flüssigkeiten – neue Lösungen für die Übergangsmetallkatalyse", *Angew. Chem.*, 112 (2000), 3926-3945; T. Welton "Room temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis", *Chem. Rev.*, 92 (1999), 2071-2083 o R. Hagiwara, Ya. Ito "Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions", *J. Fluorine Chem.*, 105 (2000), 221-227.

35 El documento WO 2004 024279 revela un uso de líquidos iónicos para la solubilización en particular de proteínas hidrófobas.

40 Sorprendentemente se ha encontrado que los líquidos iónicos de fórmula general  $K^+A^-$  son apropiados para extraer proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos de muestras biológicas. Esto también es válido cuando las muestras biológicas están fijadas, como es el caso normalmente en la preparación de muestras biológicas. El procedimiento de extracción según la invención se puede emplear también sorprendentemente en muestras fijadas, lo cual amplía enormemente las posibilidades de aplicación del procedimiento. De este modo, con el procedimiento según la invención se pueden tratar de forma universal muestras biológicas para extraer de ellas proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos. Así, el procedimiento según la invención tiene la ventaja de que los componentes que se tienen que extraer no se degradan, es decir, mantienen su constitución química. Esta es una ventaja esencial frente a los procedimientos conocidos, como los que se describen por ejemplo en el documento WO2004/080579, en los cuales las proteínas que se tienen que extraer se deben degradar a péptidos en una etapa proteolítica para después poderlos analizar. Por tanto, en conjunto con el procedimiento según la invención es posible un tratamiento sencillo de muestras biológicas para el aislamiento de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos, el cual no estaba disponible a partir del procedimiento descrito por el estado de la técnica.

55 La extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos en el procedimiento según la invención se puede realizar en todas las muestras biológicas conocidas por el especialista. Preferentemente las muestras biológicas son tejidos, como por ejemplo biopsias y preparados histológicos, células, cultivos celulares y/o fluidos corporales, como por ejemplo sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo o saliva. La extracción de proteínas de tejidos y cultivos celulares permite en particular la detección de proteínas específicas, por ejemplo para la detección de proteínas que permiten deducir la presencia de enfermedades. Por tanto, el procedimiento según la invención es ventajoso en particular también para muestras interesantes de tejido patológico.

65 Las muestras biológicas pueden estar fijadas o no estarlo, preferentemente están fijadas. Así, la fijación se puede realizar según todos los métodos conocidos por el especialista, por ejemplo mediante el uso de formalina, glutaraldehído, sustitutos de la formalina, alcoholes, como por ejemplo etanol, metanol, isopropanol, o materiales inertes, como por ejemplo parafina, ureas o polímeros. Preferentemente las muestras biológicas se fijan con formalina. La formalina es el agente de fijación más habitual en la

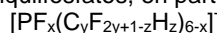
preparación de muestras histológicas y, a causa de su bajo precio y el buen rendimiento de fijación, se emplea en muchos lugares y desde hace ya más de cien años. Sin embargo, la fijación con formalina tiene la desventaja de que produce un entrecruzamiento de las proteínas con la matriz de las muestras. Por consiguiente, en general las proteínas se vuelven insolubles y no están disponibles para un análisis posterior. Mediante el uso de líquidos iónicos en el procedimiento según la invención se pueden extraer las proteínas de estas muestras, incluso manteniendo su estructura, para después analizarlas. De este modo se amplía en su viabilidad el método de fijación más habitual con formalina sin restringir las posibilidades del análisis posterior. Por tanto, mediante el uso del procedimiento según la invención ahora también se pueden investigar con el análisis de proteínas moderno muestras que ya se han conservado mucho tiempo empleando formalina, es decir, se suprime una limitación temporal de la capacidad de análisis de las muestras.

En general en el procedimiento según la invención son adecuados todos los líquidos iónicos conocidos por el especialista de fórmula general  $K^+A^-$ , por ejemplo con aniones hexafluorofosfato, tetrafluoroborato o halogenuro. Son ejemplos de líquidos iónicos apropiados trihexil(tetradecil)-fosfoniohexafluorofosfato, trihexil(tetradecil)-fosfoniocloruro o trihexil(tetradecil)-fosfoniotetrafluoroborato.

Preferentemente el anión  $A^-$  del líquido iónico se selecciona del grupo de las imidas, en particular aquellas de fórmula general



donde  $R_f$  representa alquilo con 1 a 8 átomos de C parcial o totalmente sustituido con flúor o  $R_{f2}X$ , donde  $R_{f2}$  representa alquilo con 1 a 8 átomos de C parcial o totalmente sustituido con flúor, y X representa  $SO_2$  o CO, del grupo de los fluoroalquilfosfatos, en particular aquellos de fórmula general

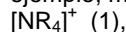


con  $1 \leq x < 6$ ,  $1 \leq y \leq 8$  y  $0 \leq z \leq 2y+1$  o de mezclas de los mismos.

Preferentemente  $R_f$  es trifluorometilo, pentafluoroetilo, nonafluorobutilo o  $R_{f2}SO_2$ , en particular trifluorometilo o  $R_{f2}SO_2$ , prefiriéndose en particular que  $R_{f2}$  sea trifluorometilo. En el caso de los fluoroalquilfosfatos se prefiere  $x = 3$ ,  $z = 0$  e  $y = 2, 3$  o  $4$ , siendo muy preferible en particular  $y = 2$ . Los fluidos iónicos que contienen los aniones especialmente preferidos  $[(CF_3SO_2)_2N]^-$  o  $[PF_3(C_2F_5)_3]^-$  son particularmente apropiados para la extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos en el procedimiento según la invención.

En lo referente a la selección de los cationes  $K^+$  del líquido aniónico, no existen limitaciones de por sí. Sin embargo, se trata preferentemente de cationes orgánicos, prefiriéndose en especial cationes amonio, fosfonio, uronio, tiouronio, guanidinio o cationes heterocíclicos.

Los cationes amonio se pueden describir, por ejemplo, mediante la fórmula (1)



donde

R representa independientemente entre sí,

H, no pudiendo ser H al mismo tiempo todos los sustituyentes R,

$OR'$ ,  $NR'_2$ , con la condición de que como máximo un sustituyente R de la fórmula (1) sea  $OR'$ ,  $NR'_2$ , alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces dobles,

alquino de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces triples,

cicloalquilo saturado, total o parcialmente insaturado, con 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo con 1-6 átomos de C, pudiendo estar sustituidos uno o varios R parcial o totalmente

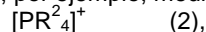
con halógenos, en particular F y/o Cl, o parcialmente con  $-OH$ ,  $-OR'$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NR'_2$ ,

$-SO_2NR'_2$ ,  $-C(O)X$ ,  $-SO_2OH$ ,  $-SO_2X$ ,  $-NO_2$ , y pudiéndose reemplazar uno o dos átomos de carbono de R no adyacentes y no en posición  $\alpha$  por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo

$-O-$ ,  $-S-$ ,  $-S(O)-$ ,  $-SO_2-$ ,  $-SO_2O-$ ,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-N^+R'^2-$ ,  $-P(O)R'O-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-SO_2NR'-$ ,  $-OP(O)R'O-$ ,

$-P(O)(NR'_2)NR'-$ ,  $-PR'_2=N-$  o  $-P(O)R'-$  con  $R'$  pudiendo ser H, alquilo  $C_1$  a  $C_6$  no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo  $C_3$  a  $C_7$ , fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

Los cationes fosfonio se pueden describir, por ejemplo, mediante la fórmula (2)



donde

$R^2$  representa independientemente entre sí,

H,  $OR'$  o  $NR'_2$

alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 20 átomos de C,

alqueno de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces dobles,

alquino de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces triples,

cicloalquilo saturado, total o parcialmente insaturado, con 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido

con grupos alquilo con 1-6 átomos de C, pudiendo estar sustituidos uno o varios  $R^2$  parcial o totalmente

con halógenos, en particular F y/o Cl, o parcialmente con  $-OH$ ,  $-OR'$ ,  $-CN$ ,  $-C(O)OH$ ,  $-C(O)NR'_2$ ,

$-SO_2NR'_2$ ,  $-C(O)X$ ,  $-SO_2OH$ ,  $-SO_2X$ ,  $-NO_2$ , y pudiéndose reemplazar uno o dos átomos de carbono de  $R^2$  no adyacentes y no en posición  $\alpha$  por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo

-O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- con R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

5 Sin embargo, se excluyen los cationes de las fórmulas (1) y (2) en los cuales todos los cuatro o los tres sustituyentes R y R<sup>2</sup> están sustituidos completamente con halógenos, por ejemplo el catión tris-(trifluorometil)metilamonio, el catión tetra(trifluorometil)amonio o el catión tetra(nonafluorobutil)amonio.

10 Los cationes uronio se pueden describir, por ejemplo, mediante la fórmula (3)  

$$[(R^3R^4N)-C(=OR^5)(NR^6R^7)]^+ \quad (3),$$

y los cationes tiuronio mediante la fórmula (4),  

$$[(R^3R^4N)-C(=SR^5)(NR^6R^7)]^+ \quad (4),$$

15 donde  
 R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> representan independientemente entre sí,  
 hidrógeno, excluyéndose el hidrógeno para R<sup>5</sup>,  
 alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 20 átomos de C,  
 alqueno de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces dobles,  
 alquino de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces triples,  
 20 cicloalquilo saturado, total o parcialmente insaturado, con 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo con 1-6 átomos de C, pudiendo estar sustituidos uno o varios de los sustituyentes R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> parcial o totalmente con halógenos, en particular F y/o Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y pudiéndose reemplazar uno o dos átomos de carbono de R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> no adyacentes y no en posición α por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-,  
 25 -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- con R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

30 Los cationes guanidinio se pueden describir mediante la fórmula (5)  

$$[C(NR^8R^9)(NR^{10}R^{11})(NR^{12}R^{13})]^+ \quad (5),$$

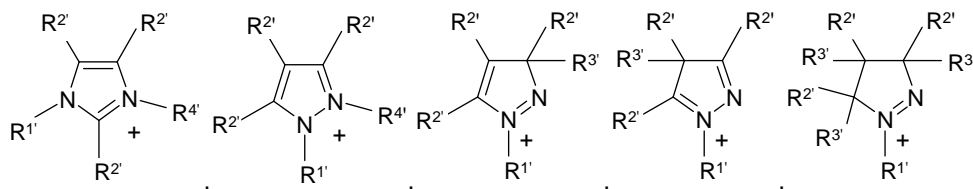
35 donde  
 R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> representan independientemente entre sí,  
 hidrógeno, -CN, NR'<sub>2</sub>, -OR'  
 alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 20 átomos de C,  
 alqueno de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces dobles,  
 alquino de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces triples,  
 cicloalquilo saturado, total o parcialmente insaturado, con 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo con 1-6 átomos de C, pudiendo estar sustituidos uno o varios de los sustituyentes R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> parcial o totalmente con halógenos, en particular F y/o Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN,  
 40 -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, y pudiéndose reemplazar uno o dos átomos de carbono de R<sup>8</sup> a R<sup>13</sup> no adyacentes y no en posición α por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- con R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

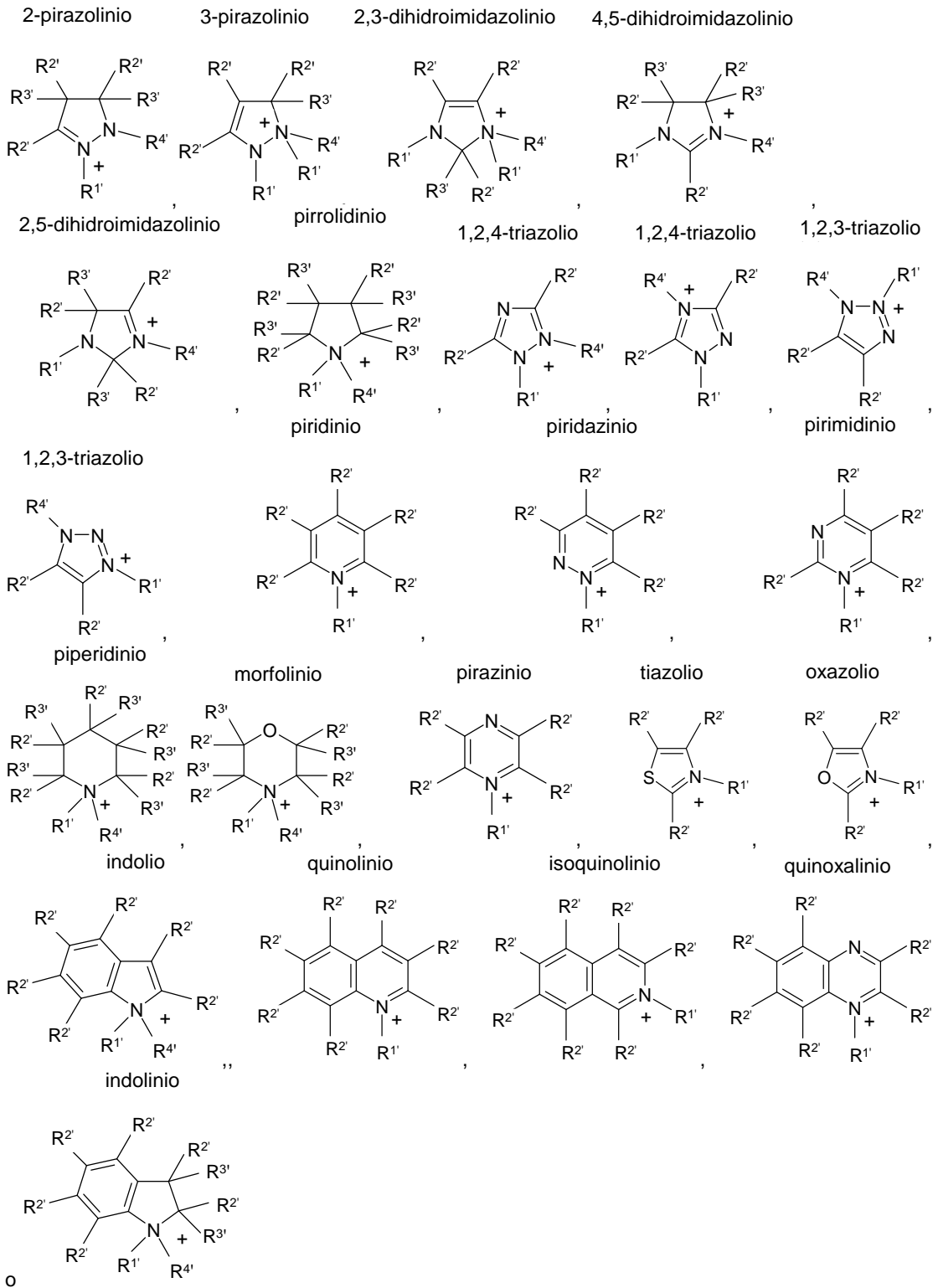
Además, se pueden emplear cationes de fórmula general (6)

50 donde  

$$[HetN]^+ \quad (6)$$

HetN<sup>+</sup> representa un catión heterocíclico seleccionado del grupo  
 imidazolio      1H-pirazolio      3H-pirazolio      4H-pirazolio      1-pirazolinio





5 donde los sustituyentes  
 10 R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup>, independientemente entre sí  
 representan hidrógeno, -CN, -OR', -NR'<sub>2</sub>, -P(O)R'<sub>2</sub>, -P(O)(OR')<sub>2</sub>, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, -C(O)R', -C(O)OR',  
 alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 20 átomos de C,  
 alqueno de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces dobles,  
 alquino de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C y uno o varios enlaces triples,  
 cicloalquilo saturado, total o parcialmente insaturado, con 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido  
 15 con grupos alquilo con 1-6 átomos de C,  
 heteroarilo saturado, total o parcialmente insaturado,  
 heteroaril-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo o aril-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo,

5 pudiendo también formar los sustituyentes R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y/o R<sup>4</sup> juntos un sistema de anillo, pudiéndose sustituir uno o varios sustituyentes R<sup>1</sup>, a R<sup>4</sup> parcial o totalmente con halógenos, en particular F y/o Cl, o -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>, pudiendo estar sustituidos completamente, aunque no simultáneamente R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> con halógenos y  
 10 diéndose reemplazar uno o dos átomos de carbono de R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> no adyacentes y no unidos a hetero-átomo, por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'- con R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido y X = halógeno.

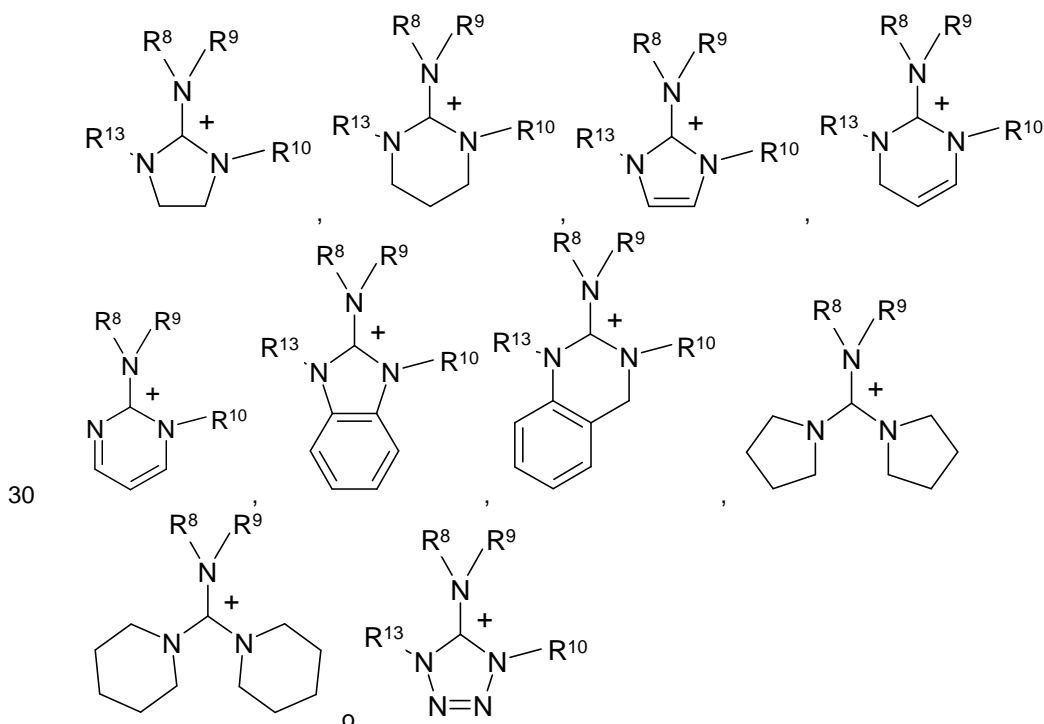
10 Se entiende por sustituyentes totalmente insaturados en el sentido de la presente invención también los sustituyentes aromáticos.

15 Como sustituyentes R y R<sup>2</sup> a R<sup>13</sup> de los compuestos de las fórmulas (1) a (5) se tienen en consideración según la invención, además de hidrógeno, preferentemente: grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>20</sub>, en particular C<sub>1</sub> a C<sub>14</sub> y grupos cicloalquilo saturados o insaturados, es decir, también aromáticos, C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, que pueden estar sustituidos con grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, en particular fenilo.

20 Los sustituyentes R y R<sup>2</sup> en los compuestos de fórmula (1) o (2) pueden ser iguales o diferentes. Preferentemente los sustituyentes R y R<sup>2</sup> son diferentes.

Los sustituyentes R y R<sup>2</sup> son en particular preferentemente metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo o tetradecilo.

25 Hasta cuatro sustituyentes del catión guanidinio [C(NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)(NR<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)(NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>)]<sup>+</sup> también pueden estar enlazados por parejas de manera que forman cationes mono-, bi- o policíclicos. Sin limitar la generalidad son ejemplos para dichos cationes guanidinio:

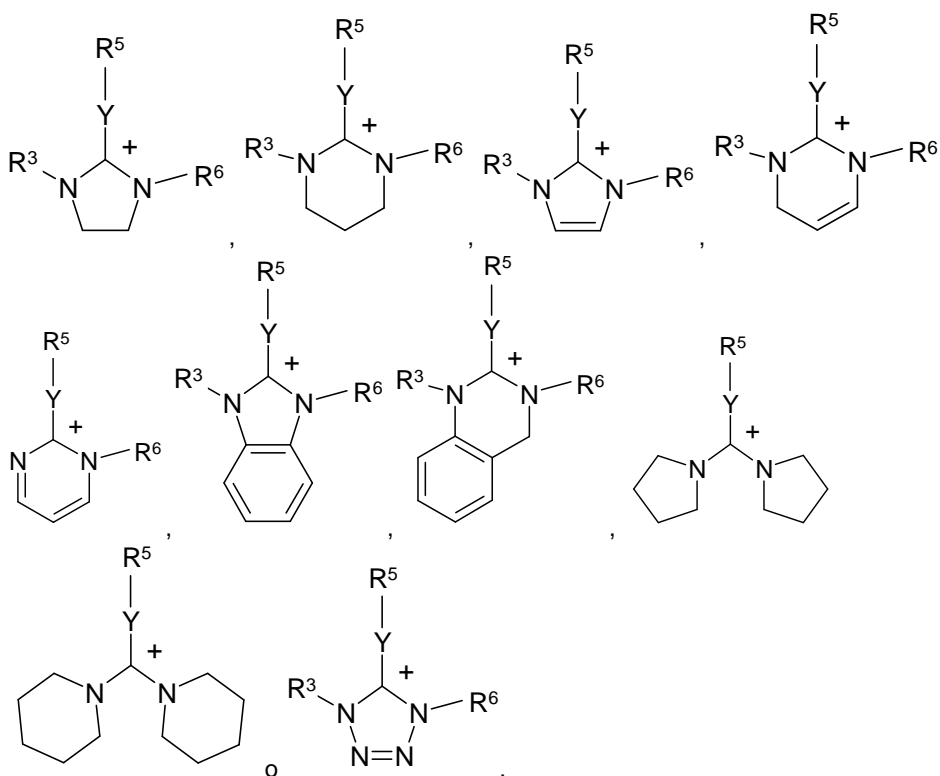


pudiendo tener los sustituyentes R<sup>8</sup> a R<sup>10</sup> y R<sup>13</sup> un significado indicado anteriormente o especialmente preferido.

35 Dado el caso, los carbociclos o heterociclos de los cationes guanidinio indicados anteriormente pueden estar sustituidos por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>X' o SO<sub>3</sub>H, teniendo X y R' un significado indicado anteriormente, fenilo sustituido o no sustituido o heterociclo sustituido o no sustituido.

40 Hasta cuatro sustituyentes del catión uronio [(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>N)-C(=OR<sup>5</sup>)(NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)]<sup>+</sup> o del catión tiouronio [(R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>N)-C(=SR<sup>5</sup>)(NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)]<sup>+</sup> pueden estar enlazados también por parejas de manera que forman cationes mono-, bi- o policíclicos.

A continuación se indican ejemplos para dichos cationes, representando Y = O o S:



5

pudiendo tener los sustituyentes  $R^3$ ,  $R^5$  y  $R^6$  un significado indicado anteriormente o especialmente preferido.

Dado el caso, los carbociclos o heterociclos de los cationes indicados anteriormente pueden estar sustituidos por alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , alquenilo  $C_1$  a  $C_6$ ,  $NO_2$ , F, Cl, Br, I, OH, alcoxi  $C_1$ - $C_6$ ,  $SCF_3$ ,  $SO_2CF_3$ ,  $COOH$ ,  $SO_2NR'_2$ ,  $SO_2X$  o  $SO_3H$  o fenilo sustituido o no sustituido o heterociclos sustituidos o no sustituidos, teniendo X y  $R'$  un significado indicado anteriormente.

Los sustituyentes  $R^3$  a  $R^{13}$  son respectivamente independientes entre sí, preferentemente un grupo alquilo lineal o ramificado con 1 a 10 átomos de C. Los sustituyentes  $R^3$  y  $R^4$ ,  $R^6$  y  $R^7$ ,  $R^8$  y  $R^9$ ,  $R^{10}$  y  $R^{11}$  y  $R^{12}$  y  $R^{13}$  en compuestos de fórmula (3) a (5) pueden ser iguales o diferentes. Se prefieren en particular  $R^3$  a  $R^{13}$  independientemente entre sí, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, fenilo o ciclohexilo, de forma especialmente preferida metilo, etilo, n-propilo, isopropilo o n-butilo.

Como sustituyentes  $R^1$  a  $R^4$  de los compuestos de la fórmula (6) se tienen en consideración según la invención, además del hidrógeno, preferentemente: grupos alquilo  $C_1$  a  $C_{20}$ , en particular  $C_1$  a  $C_{12}$  y grupos cicloalquilo saturados o insaturados, es decir, también aromáticos  $C_3$  a  $C_7$ , que pueden estar sustituidos con grupos alquilo  $C_1$  a  $C_6$ , en particular fenilo.

Los sustituyentes  $R^1$  y  $R^4$  son independientemente entre sí en particular preferentemente metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo. Son con especial preferencia metilo, etilo, n-butilo o hexilo. En compuestos pirrolidinio, piperidinio o indolinio ambos sustituyentes  $R^1$  y  $R^4$  son preferentemente diferentes.

El sustituyente  $R^2$  o  $R^3$ , independientemente entre sí, es en particular hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo, terc-butilo, ciclohexilo, fenilo o bencilo. Se prefiere especialmente que  $R^2$  sea hidrógeno, metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo o sec-butilo. De forma muy particularmente preferente  $R^2$  y  $R^3$  son hidrógeno.

El grupo alquilo  $C_1$ - $C_{12}$  es por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, propilo, butilo, sec-butilo o terc-butilo, aunque también pentilo, 1-, 2- o 3-metilbutilo, 1,1-, 1,2- o 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo o dodecilo. Dado el caso difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo o nonafluorobutilo.

Un alquenilo de cadena lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de C, pudiendo tener también varios enlaces dobles, es por ejemplo alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, también 4-pentenilo, isopentenilo, hexenilo, heptenilo, octenilo,  $-C_9H_{17}$ ,  $-C_{10}H_{19}$  hasta  $-C_{20}H_{39}$ ; preferentemente alilo, 2- o 3-butenilo, isobutenilo, sec-butenilo, prefiriéndose también 4-pentenilo, iso-pentenilo o hexenilo.

Un alquino de cadena lineal o ramificada con 2 a 20 átomos de C, pudiendo tener también varios enlaces triples, es por ejemplo etinilo, 1- o 2-propinilo, 2- o 3-butinilo, también 4-pentinilo, 3-pentinilo, hexinilo, heptinilo, octinilo, -C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>, -C<sub>10</sub>H<sub>17</sub> hasta -C<sub>20</sub>H<sub>37</sub>, preferentemente etinilo, 1- o 2-propinilo, 2- o 3-butinilo, 4-pentinilo, 3-pentinilo o hexinilo.

Aril-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo representa por ejemplo bencilo, feniletilo, fenilpropilo, fenilbutilo, fenilpentilo o fenilhexilo, pudiendo estar sustituidos tanto el anillo fenilo como la cadena alqueno, como se describe anteriormente, parcial o totalmente con halógenos, en particular -F y/o -Cl, o parcialmente con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>.

Grupos cicloalquilo no sustituidos saturados o total o parcialmente insaturados, con 3-7 átomos de C, son por tanto ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclopenta-1,3-dienilo, ciclohexenilo, ciclohexa-1,3-dienilo, ciclohexa-1,4-dienilo, fenilo, cicloheptenilo, ciclohepta-1,3-dienilo, ciclohepta-1,4-dienilo o ciclohepta-1,5-dienilo, los cuales pueden estar sustituidos con grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, donde además los grupos cicloalquilo o los grupos cicloalquilo sustituidos con grupos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> pueden estar sustituidos también por átomos de halógeno como F, Cl, Br o I, en particular F o Cl, o con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, -C(O)X, -SO<sub>2</sub>OH, -SO<sub>2</sub>X, -NO<sub>2</sub>.

En los sustituyentes R, R<sup>2</sup> a R<sup>13</sup> o R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> uno o dos átomos de carbono no adyacentes y no en posición  $\alpha$  respecto al heteroátomo también pueden estar sustituidos por átomos y/o agrupaciones de átomos seleccionados del grupo -O-, -S-, -S(O)-, -SO<sub>2</sub>-, -SO<sub>2</sub>O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N<sup>+</sup>R'<sub>2</sub>-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO<sub>2</sub>NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'<sub>2</sub>)NR'-, -PR'<sub>2</sub>=N- o -P(O)R'-, con R' = H, alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub>, fenilo sustituido o no sustituido.

Ejemplos de sustituyentes R, R<sup>2</sup> a R<sup>13</sup> y R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> modificados de esta forma son :  
-OCH<sub>3</sub>, -OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>SCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -S(O)CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -SO<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -SO<sub>2</sub>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, -SO<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -O-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-O-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, -CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, -C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, -C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>, -C(CF<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CF<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>N(C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>)C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>F<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, -C<sub>3</sub>FH<sub>6</sub>, -CH<sub>2</sub>C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>, -C(CFH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>C(O)OH, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -C(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> o P(O)(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>.

En R' el cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> es por ejemplo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

En R' el fenilo sustituido representa fenilo sustituido por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>X', SO<sub>2</sub>NR''<sub>2</sub> o SO<sub>3</sub>H, representando X' F, Cl o Br y R'' un alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> o cicloalquilo C<sub>3</sub> a C<sub>7</sub> no perfluorado, parcial o totalmente perfluorado, como se define para R', por ejemplo, o-, m- o p-metilfenilo, o-, m- o p-etilfenilo, o-, m- o p-propilfenilo, o-, m- o p-isopropilfenilo, o-, m- o p-terc-butilfenilo, o-, m- o p-nitrofenilo, o-, m- o p-hidroxifenilo, o-, m- o p-metoxifenilo, o-, m- o p-etoxifenilo, o-, m-, p-(trifluorometil)fenilo, o-, m-, p-(trifluorometoxi)fenilo, o-, m-, p-(trifluorometilsulfonil)fenilo, o-, m- o p-fluorofenilo, o-, m- o p-clorofenilo, o-, m- o p-bromofenilo, o-, m- o p-yodofenilo, preferiblemente también 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetilfenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dihidroxifenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-difluorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-diclorofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dibromofenilo, 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- o 3,5-dimetoxifenilo, 5-fluoro-2-metilfenilo, 3,4,5-trimetoxifenilo o 2,4,5-trimetilfenilo.

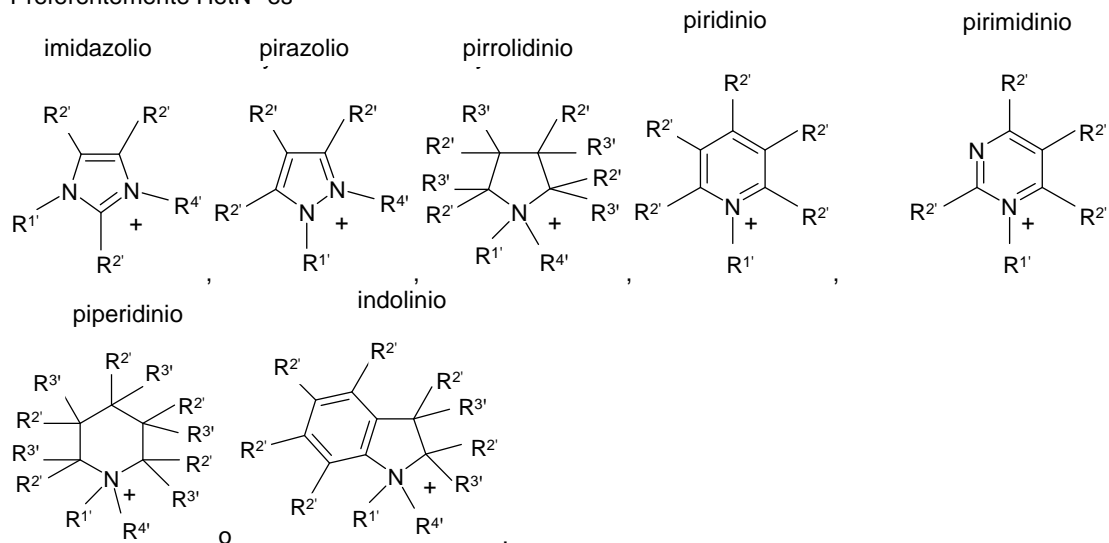
En R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> se entiende por heteroarilo un resto heterocíclico saturado o insaturado mono- o bicíclico con anillo de 5 a 13 miembros, pudiendo presentar 1, 2 o 3 átomos de N y/o 1 o 2 de S u O y pudiendo estar el resto heterocíclico sustituido una o varias veces por alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, OH, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, SCF<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>X', SO<sub>2</sub>NR''<sub>2</sub> o SO<sub>3</sub>H, teniendo X' y R'' un significado indicado anteriormente.

El resto heterocíclico, sustituido o no sustituido, es preferentemente 2- o 3-furilo, 2- o 3-tienilo, 1-, 2- o 3-pirrolilo, 1-, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 2-, 4-, 5- o 6-pirimidinilo, prefiriéndose además 1,2,3-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1,2,4-triazol-1-, -4- o -5-ilo, 1- o 5-tetrazolilo, 1,2,3-oxadiazol-4- o -5-ilo, 1,2,4-oxadiazol-3- o -5-ilo, 1,3,4-tiadiazol-2- o -5-ilo, 1,2,4-tiadiazol-3- o -5-ilo, 1,2,3-tiadiazol-4- o -5-ilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-2H-tiopyranilo, 2-, 3- o 4-4H-tiopyranilo, 3- o 4-piridazinilo, pirazinilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzofurilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotienilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-1H-indolilo, 1-, 2-, 4- o 5-benzimidazolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzopirazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoisoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoisotiazolilo, 4-, 5-, 6- o 7-benzo-2,1,3-oxadiazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinolinilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-isoquinolinilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 9-carbazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridinilo, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-cinolinilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7- o 8-quinazolinilo o 1-, 2- o 3-pirrolidinilo.

Se entiende por heteroaril-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo, de forma análoga a aril-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alquilo, por ejemplo, piridinilmetilo, piridinil-etilo, piridinil-propilo, piridinil-butilo, piridinil-pentilo, piridinil-hexilo, pudiéndose enlazar de este modo también los heterociclos anteriormente descritos con las cadenas alqueno.



Preferentemente HetN<sup>+</sup> es



5

donde los sustituyentes R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> independientemente entre sí tienen un significado descrito anteriormente.

10 Los cationes del líquido iónico según la invención son preferentemente cationes amonio, fosfonio, imidazolio, piridinio o pirrolidinio.

Se emplean de forma especialmente preferida amonio-, fosfonio-, imidazolio-, piridinio- o pirrolidinio-  
 15 trifluorometilsulfonilimidias, o amonio- o fosfoniotris(pentafluoroetil)trifluorofosfatos para la extracción en el procedimiento según la invención, proporcionando resultados especialmente buenos en el procedimiento según la invención trihexil(tetradecil)-fosfonio-hexafluorofosfato, trihexil(tetradecil)-fosfonio-  
 20 cloruro, trihexil(tetradecil)-fosfonio-tetrafluoroborato, N-(3-hidroxiopropil)-N-metilpirrolidinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-(etoximetil)-N-metilpirrolidinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-(2-metoxietil)-N-metilpirrolidinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-(2-metoxietil)piridinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-etil-4-(N,N-dimetilamonio)piridinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-butil-4-(N,N-dimetilamonio)piridinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-hexil-4-(N,N-dimetilamonio)piridinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, 1-(3-hidroxiopropil)-3-metil-imidazolio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, 1-(etoximetil)-3-metil-imidazolio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, 1-(2-metoxietil)-3-metil-imidazolio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, 1-(2-etoxietil)-3-metil-imidazolio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, tetra-butil-amonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, tetra-etil-amonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, trihexil(tetradecil)amonio-trifluorometilsulfonilimida, metil-trioctil-amonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, (etoximetil)etildimetilamonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, (2-etoximetil)etildimetilamonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, (2-etoxietil)etildietilamonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, etildimetilpropilamonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, trihexil(tetradecil)-fosfonio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, trihexil(tetradecil)-fosfonio-tris(pentafluoroetil)-trifluorofosfato, tetrabutil-fosfonio-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, tetra-metil-amonio-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, tetra-etil-amonio-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato o tetra-butil-amonio-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato, y se prefiere en particular N-(3-hidroxiopropil)-N-metilpirrolidinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, N-(etoximetil)-N-metilpirrolidinio-bis-(trifluorometilsulfonil)imida, trihexil(tetradecil)-amoniotrifluorometilsulfonilimida, trihexil(tetradecil)fosfoniotrifluorometilsulfonilimida o tetra-butil-amonio-tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato.

35

Los procedimientos según la invención se pueden llevar a cabo a temperaturas de 0 a 95 °C, preferentemente de 55 a 65 °C y de forma muy especial se prefieren 60°C. A las temperaturas preferidas se observa una extracción mejorada en un tiempo relativamente corto. Para la extracción cuidadosa, en particular de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos sensibles, se recomienda la realización del procedimiento según la invención a temperaturas más bajas dentro del intervalo de temperaturas indicado, teniendo en cuenta un tiempo de extracción más largo necesario para ello.

40

Los procedimientos según la invención son adecuados para la extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos de muestras biológicas, manteniendo la estructura celular básica de las muestras. Asimismo, también se puede pensar la aplicación de los procedimientos según la invención en muestras correspondientemente pretratadas en las que, por ejemplo, la estructura celular básica se destruyó antes de la aplicación del procedimiento según la invención. Este tratamiento previo se puede realizar de todas las maneras conocidas por el especialista, por ejemplo mediante homogeneización manual o agitación en vórtice.

50

Los extractos obtenidos con ayuda del procedimiento según la invención contienen proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos. Estos son apropiados para todos los tipos de análisis de proteínas conocidos por el especialista, por ejemplo, electroforesis (por ejemplo, electroforesis en gel bidimensional), métodos de detección inmunoquímicos (por ejemplo, análisis de transferencia Western ELISA, RIA), chips de proteínas (por ejemplo sistemas planares y basados en perlas), espectrometría de masas (por ejemplo, Maldi, Esi y SELDI), así como todos los procedimientos de separación biocromáticos (IEX, SEC, HIC y cromatografía de afinidad).

**Ejemplos**

10 **Ejemplo 1**

1 g de una muestra de tejido fijada con formalina (por ejemplo, pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo) se lava varias veces con 10 ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato y se desmenuza con un escalpelo. 0,1 g de la muestra desmenuzada se mezclan con 60 µl de trihexil(tetradecil)-fosfonio-trifluorometilsulfonilimida y se incuba a 60°C durante un periodo de tiempo de dos horas en un mezclador rotatorio. Se separa la solución sobrenadante y se puede emplear para proseguir el análisis de las proteínas contenidas en su interior.

Análisis de proteínas

20 Con el extracto obtenido en el Ejemplo 1 se realiza una electroforesis de gel de poliacrilamida-SDS como sigue: 3 µl del extracto de proteínas se mezclan con 16 µl de tampón de tratamiento de muestras SDS (Tris pH 8,5 3M, glicerina 24 % (v/v), dodecilsulfato sódico 8% (p/v), 2-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0,1% (p/v)) y se incuban 5 minutos a 95°C. Tras la centrifugación a 10000xg se aplica la muestra a un SDS-Page 10% y se separa 90 minutos a 120 voltios.

25 Para la identificación de las proteínas extraídas se realiza una transferencia Western del gel mediante el uso de anticuerpos, por ejemplo contra la proteína de membrana calnexina (90 kDa, Anti-Calnexina, C-terminal, 1:2000, Calbiochem N.ºCat.: 208880). En el análisis de transferencia Western se identifica la calnexina en su tamaño molecular nativo.

30 En conjunto se demuestra que el procedimiento según la invención es adecuado para la extracción de forma ventajosa de proteínas de muestras biológicas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la extracción de proteínas, fragmentos de proteínas y/o péptidos de muestras biológicas, **caracterizado por que** como agente de extracción se emplean líquidos iónicos de fórmula general  $K^+A^-$ .
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** las muestras biológicas son tejidos, células, cultivos celulares y/o fluidos corporales.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** las muestras biológicas están fijadas.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado por que** las muestras biológicas están fijadas con formalina.
- 15 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 4, **caracterizado por que** los aniones  $A^-$  del líquido iónico se seleccionan del grupo de las imidas de fórmula general  $[N(R_1)_2]^+$ , representando  $R_1$  alquilo con 1 a 8 átomos de C sustituido total o parcialmente con flúor o  $R_{f2}X$ , representando  $R_{f2}$  alquilo con 1 a 8 átomos de C sustituido total o parcialmente con flúor y X  $SO_2$  o  $CO$ , del grupo de los fluoroalquilfosfatos de fórmula general  $[PF_x(C_yF_{2y+1-z}H_z)_{6-x}]^-$  con  $1 \leq x < 6$ ,  $1 \leq y \leq 8$  y  $0 \leq z \leq 2y+1$  o de las mezclas de los mismos.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 5, **caracterizado por que** los cationes  $K^+$  del líquido iónico se seleccionan del grupo de cationes amonio, fosfonio, uronio, tiuronio, guanidinio o cationes heterocíclicos.
- 25 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones de la 1 a la 6, **caracterizado por que** la extracción se realiza a temperaturas de 0 a 95°C.