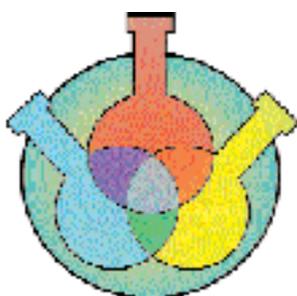


Química combinatoria



¿Sabes lo que es una biblioteca?: un lugar donde se almacenan y se clasifican los libros; y, ¿una biblioteca química?: es un matraz que contiene una gran cantidad de compuestos que están también clasificados.

Ignacio A. Rivero Espejel

NUEVOS PRODUCTOS

El desarrollo tecnológico requiere que las técnicas científicas evolucionen constantemente. La química permite realizar modificaciones a la materia, y de manera constante la industria química requiere sustancias más eficientes y seguras, así como optimizar sus métodos de obtención.

Anteriormente, las industrias recurrían a los métodos tradicionales de síntesis, los cuales requieren varias etapas antes de que sus productos lleguen al mercado. Se ha establecido que de cada 10 mil compuestos que se sintetizan, sólo uno tiene la posibilidad de ser factible y ser estudiado más a fondo. Para que un medicamento pueda salir al mercado se requiere que sea estudiado en las diferentes fases del proceso, entre miles de moléculas análogas.

Entre las limitantes más importantes para el desarrollo de nuevos productos químicos está la necesidad de contar con métodos de evaluación y pruebas biológicas sencillas, sensibles, selectivas, rápidas y que garanticen las ventajas de los nuevos principios activos sobre de los que ya han sido aprobados para su uso

comercial. Para probar millones de compuestos, es necesario tener un protocolo de síntesis muy eficiente para lograr una gran diversidad de moléculas (una “biblioteca”), así como tener una plantilla de profesionales especializados y que los tiempos requeridos en cada etapa sean optimizados. Por tanto, se debe usar el menor número de etapas de síntesis en el menor tiempo de producción y con el menor número de recursos técnicos y humanos posibles.

Una metodología que permite la realización de estas bibliotecas es la fase sólida; es casi seguro que en el futuro las nuevas sustancias no serán ya preparadas por métodos convencionales en disolución.

SÍNTESIS ORGÁNICA EN FASE SÓLIDA

Es una técnica experimental que se basa en la utilización de un soporte sólido funcionaliza-

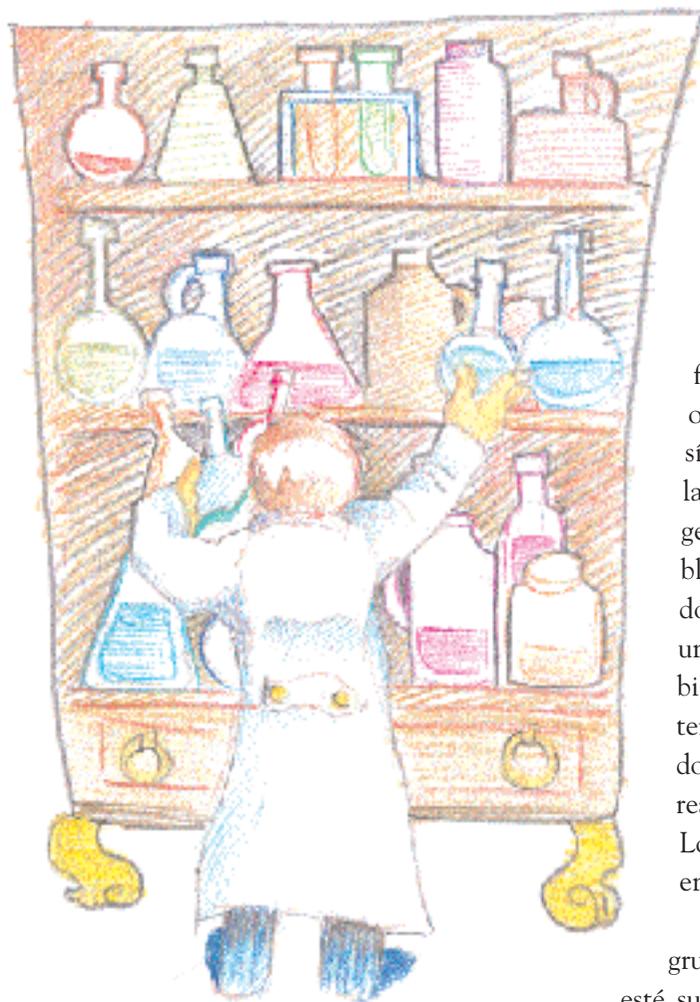
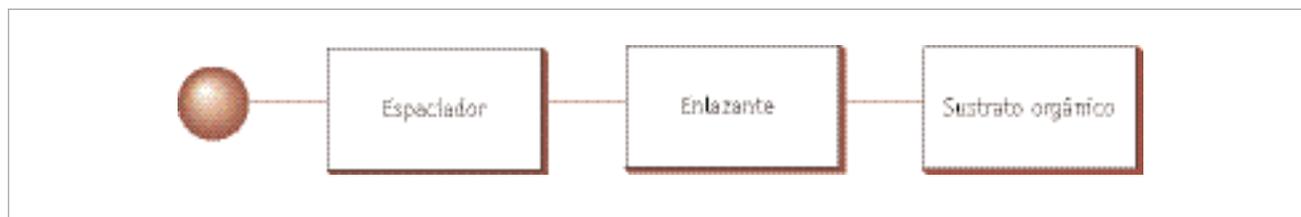


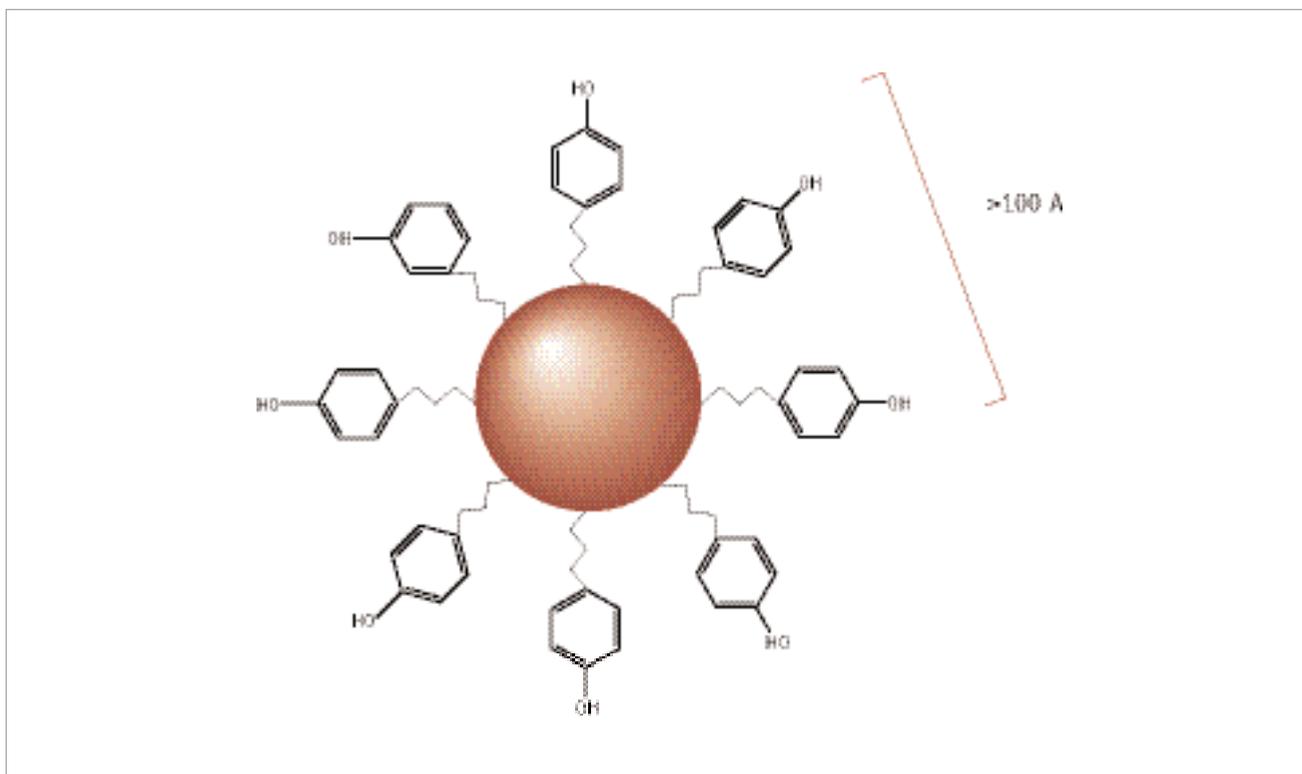
Figura 1. Componentes de la fase sólida.

do, al que se une en forma covalente un sustrato orgánico, y sobre el cual se llevan a cabo las transformaciones químicas necesarias para llegar al producto deseado. El primero en incorporar sustancias orgánicas a soporte sólido fue Merrifield (1985, 1963, Barany y Merrifield, 1979), quien por su aportación en la síntesis de péptidos recibió el premio Nobel.

Un factor determinante en la síntesis orgánica en fase sólida es el soporte sólido; puede ser inorgánico u orgánico. En la primera clase pueden mencionarse la sílice, alúmina, carbón, yeso, zeolitas, etcétera. En la segunda, se encuentran las resinas poliméricas, que generalmente tienen forma de perlas de tamaño variable. Originalmente el soporte sólido fue utilizado por dos de sus características: la primera es que actúa como un excelente grupo protector; la segunda es su insolubilidad en la mayoría de disolventes. Esta última característica permite el uso de procesos simples como lavado y filtración; de esta manera se pueden eliminar los reactivos sobrantes y favorece la síntesis automatizada. Los componentes de la resina de trabajo se muestran en la figura 1.

La esfera corresponde a la matriz del polímero; el grupo espaciador es necesario para que el sitio de unión esté suficientemente separado de la superficie sólida para permitir que las interacciones con el reactivo sean más efectivas; en caso de que el grupo espaciador sea pequeño, los sitios se verán ocluidos o bloqueados por el soporte. El grupo enlazante es determinante en este proceso, ya que debe cumplir dos requisitos fundamentales: primero, formar uniones estables en las diferentes etapas a que será sometido el sustrato, y segundo, que deben liberarse fácilmente, evitando la degradación del soporte o del sustrato. El soporte sólido es la única característica que distingue la síntesis en fase sólida de otras técnicas. Los requerimientos generales para el uso del soporte son los siguientes: contener sitios activos (Figura 2) que formen uniones covalentes con el sustrato; que sean estables en las condiciones físicas





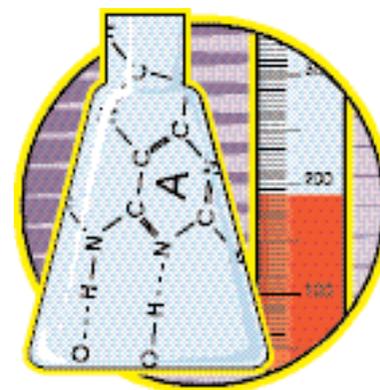
y químicas de las diferentes etapas de la síntesis; que las distancias entre los grupos enlazantes sean suficientes para evitar reacciones cruzadas, permitiendo un anclaje unimolecular, y finalmente que el sustrato se pueda liberar fácilmente.

Figura 2. Forma y distribución de los componentes de una "perla".

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FASE SÓLIDA

Las ventajas potenciales de la síntesis en fase sólida son:

1. El soporte polimérico activado es fácil de separar de las especies de bajo peso molecular.
2. La fácil recuperación del polímero hace posible regenerarlo y reusarlo en posteriores síntesis. Esto es muy importante en la síntesis industrial, desde un punto de vista económico.
3. Este método elimina pérdidas por manipulación física, porque todas las reacciones se llevan a cabo en el mismo reactor y por tanto el trabajo puede ser automatizado.
4. La purificación de los intermediarios es un procedimiento rutinario de lavado, lo cual elimina pérdidas.
5. La reacción puede ser llevada a cabo con un exceso del reactivo para forzar que se completen las reacciones individuales, favoreciendo un alto rendimiento del producto final; el reactivo no utilizado puede ser eliminado fácilmente de la reacción.
6. El soporte polimérico es inodoro y no tóxico, consideraciones importantes desde un punto de vista ambiental.



Las desventajas más importantes son: a) la selección del grupo enlazante, debido a que comercialmente existe un número limitado de resinas preparadas, y éstas son costosas y, b) el método de análisis para el monitoreo en cada una de las etapas.

EL PRINCIPIO DE ANZUELO

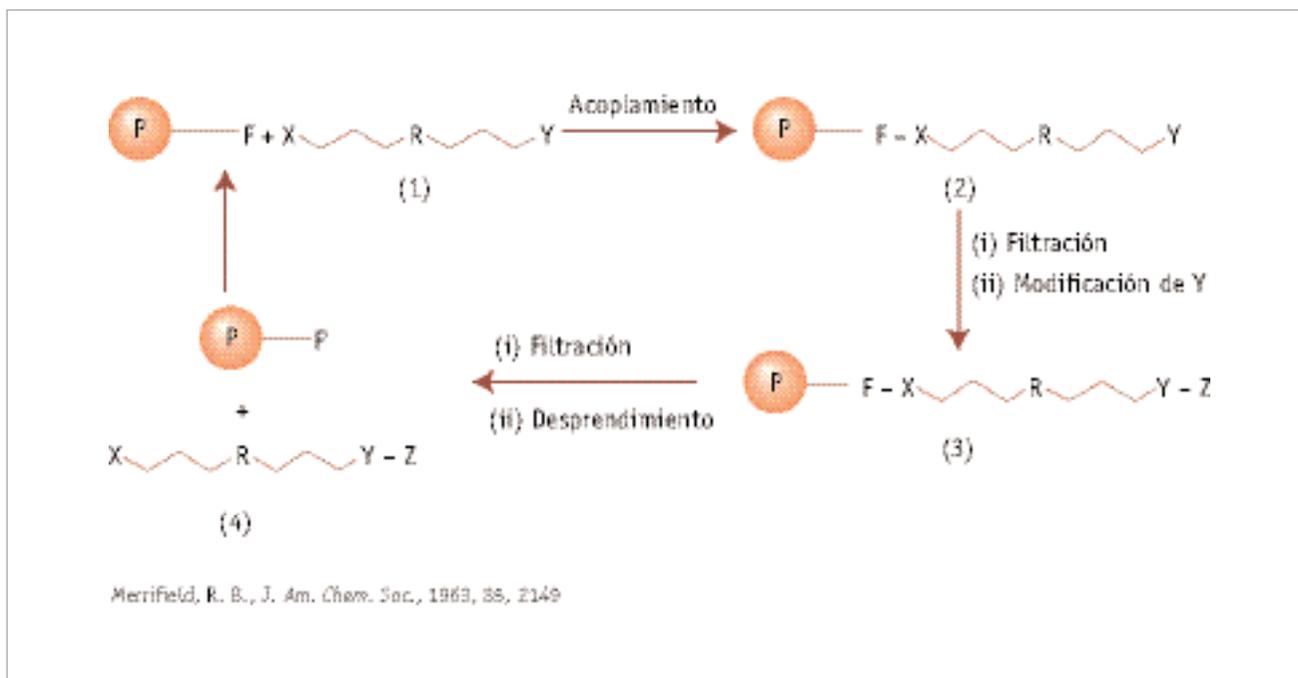
La idea original de R. B. Merrifield era la de usar al soporte polimérico como grupo protector en la síntesis de péptidos. En la figura 3 se muestra el “principio de anzuelo”, que consiste en que el enlazante funge como el anzuelo al que queda anclado el sustrato en la resina. En el mismo esquema se muestra el procedimiento

de la síntesis en fase sólida, que consiste en acoplar el sustrato a la resina. Los excesos de disolventes y subproductos de la reacción son eliminados por medio de métodos simples como filtración y lavado. Posteriormente se vuelve a realizar una segunda reacción sobre el sustrato, se repiten los procesos simples de purificación y finalmente se puede liberar el producto de la resina, o se procede con otra modificación al sustrato. De esta manera, el proceso es cíclico y se pueden hacer modificaciones cuantas veces se requiera. Esto es importante, ya que es la característica fundamental para que el sistema se pueda automatizar.

LIBERACIÓN DEL PRODUCTO

El uso de la resina de Merrifield para sintetizar péptidos requiere del uso de ácido fluorhídrico y ácido bromhídrico en condiciones extremas para poder desprender al péptido del soporte. No es posible realizar síntesis con sustratos sensibles que puedan ser destruidos por estas condiciones de liberación. Por ello, hoy se utilizan resinas que contengan propiedades de liberación más suaves que no afecten el producto, como la resina de Wang, que permite liberar a los compuestos en condiciones más suaves (ácido trifluoroacético diluido al 50 por ciento). Se utiliza para anclar un ácido carboxílico formando un éster con el hidroxilo de la resina (figura 4). En sustratos más sensibles, se utiliza la llamada “resina súper sensible al ácido”, con la que se puede liberar al producto con ácidos muy diluidos (1 a 5 por ciento).

Figura 3. Principio de anzuelo.





BIBLIOTECAS QUÍMICAS

Una biblioteca química es una serie de sustancias similares que han sido preparadas para un fin específico. Se pueden preparar bibliotecas de catalizadores, aleaciones para la desulfuración del petróleo, sensores ópticos y biológicos, vacunas, antibióticos, vitaminas y otros productos farmacéuticos, etcétera.

Las bibliotecas de diferentes dimensiones dependen de variables como la resina, el enlazante y el espaciador, la funcionalización del sustrato, los reactivos, las condiciones de reacción, etcétera. Como se mencionó, el número de compuestos posibles es demasiado grande para sintetizarlos en corto tiempo, por lo que se han desarrollado métodos químicos que permiten obtener todos los compuestos al mismo tiempo; a este proceso se le conoce como “química en paralelo”. Esto sólo es posible con métodos que permiten la automatización de los procedimientos relacionados con las reacciones y sus combinaciones. Otro factor a considerar es que no todos los procedimientos utilizados en la química convencional son factibles en los procesos automatizados. La incorporación de resinas poliméricas ha resuelto en gran medida el problema.

La preparación de bibliotecas químicas puede realizarse principalmente de dos formas:

- *Única o sencilla*: cada perla contiene un tipo particular de compuestos.
- *Mixta*: una perla contiene una amplia variedad de compuestos.

En bibliotecas que requieren de reacciones secuenciales, los protocolos o procedimientos de reacción deben ser técnicas simples y repetitivas. Éstas serán candidatas idóneas para la síntesis automatizada, la cual se realizará en tiempos bastante cortos. El área más desarrollada en la actualidad es la síntesis de péptidos, que requiere de eslabones de aminoácidos consecutivos y secuenciales.

La síntesis simultánea o “química en paralelo” fue iniciada por Geysen (1984, 1987) y colaboradores, los cuales observaron

Figura 4. Reacción típica en la fase sólida.

que muchas de las etapas en una síntesis eran rutinarias y podían ser realizadas al mismo tiempo. Con estas técnicas se logra sintetizar más de 10 mil secuencias de aminoácidos en dos semanas. A los métodos involucrados en la síntesis robotizada de bibliotecas de compuestos peptídicos, oligoméricos y no oligoméricos se les ha denominado “química combinatoria”. En la actualidad se preparan comercialmente bibliotecas de moléculas pequeñas como péptidos, alcaloides, benzodiazepinas, oligonucleótidos y diversas moléculas pequeñas.

La química “ortodoxa”, formal o en solución, requiere de métodos convencionales como campanas, vasos de precipitado, mantas de calentamiento, matraces, columnas: todo el arsenal del químico. La química combinatoria puede utilizar el mismo sistema, pero con un número mínimo de componentes, o bien usar los “sintetizadores” disponibles en el mercado, sistemas altamente sofisticados que realizan operaciones

automatizadas para efectuar procesos químicos que permiten la síntesis de una gran diversidad de compuestos.

¿QUÉ ES LA QUÍMICA COMBINATORIA?

La química combinatoria es una técnica que permite la preparación de una gran cantidad de sustancias con una gran diversidad. Furka y colaboradores (1991) fueron los primeros en hacer mención de este método, que consiste en “combinar y separar”; esto se logra de manera muy simple, como se muestra en la figura 5.

En este diagrama se utilizan inicialmente, en la primera etapa de síntesis, tres reacciones diferentes; los productos de estas tres reacciones que se hicieron por separado se mezclan y se separan en tres porciones iguales. Se realiza la segunda etapa de reacción y los productos se mezclan y se separan en tres cantidades similares. Dependiendo de las generaciones de “combinación y separación”, habrá un mayor o menor número de combinaciones posibles.



LOS MÉTODOS DE LA QUÍMICA COMBINATORIA

Existen varias formas de preparar bibliotecas de una gran diversidad de compuestos que pueden estar contenidos en forma singular o como una mezcla de productos (Rivero, 2005). Generalmente se utiliza a la fase sólida como soporte; una perla puede contener un compuesto único o una variedad de compuestos.

En la figura 5 se muestra el uso de tres reactores con resina-enlazante que reaccionan separadamente con los primeros componentes (A^1 - A^3). Después de esta reacción, las resinas son mezcladas y divididas en porciones del mismo tamaño para asegurar una distribución uniforme de los componentes. La siguiente etapa se realiza con los reactivos B^1 - B^3 , obteniéndose nueve diferentes compuestos en sólo dos etapas de reacción. El número final de compuestos son producidos en forma exponencial: dependiendo de la cantidad de etapas y del número de divisiones, se pueden sintetizar miles de diferentes compuestos en cada reactor. Finalmente se obtendrán tres diferentes bibliotecas de compuestos, una en cada reactor.

Se utilizan diferentes materiales para el soporte sólido: poliestireno en forma de perlas, barras, acetatos, gel de sílice, láminas de oro, vidrio en esferas porosas o láminas, etcétera (Smith, 1992).

CÓMO HALLAR EL COMPUESTO ÓPTIMO

Es necesario contar con un método de análisis rápido, sensible y poco costoso, ya que se requiere probar el gran número de componentes de la biblioteca. Una vez sintetizada de acuerdo con la técnica de “combinar y separar”, se requiere determinar en cuál de las bibliotecas se encuentra la sustancia más importante. Se realiza la síntesis en la generación anterior, como se muestra en la figura 6; en este proceso no se mezclan los productos, que luego se analizan directamente. Este procedimiento se repite hasta identificar al compuesto responsable de la actividad.

Se han desarrollado algunos métodos para determinar cuál de los componentes de la biblioteca es de interés:

- *Deconvolución recursiva*: consiste en sintetizar las etapas anteriores y probar en qué secuencias se encuentra el principio de interés; es como si se buscara la raíz de un árbol genealógico.

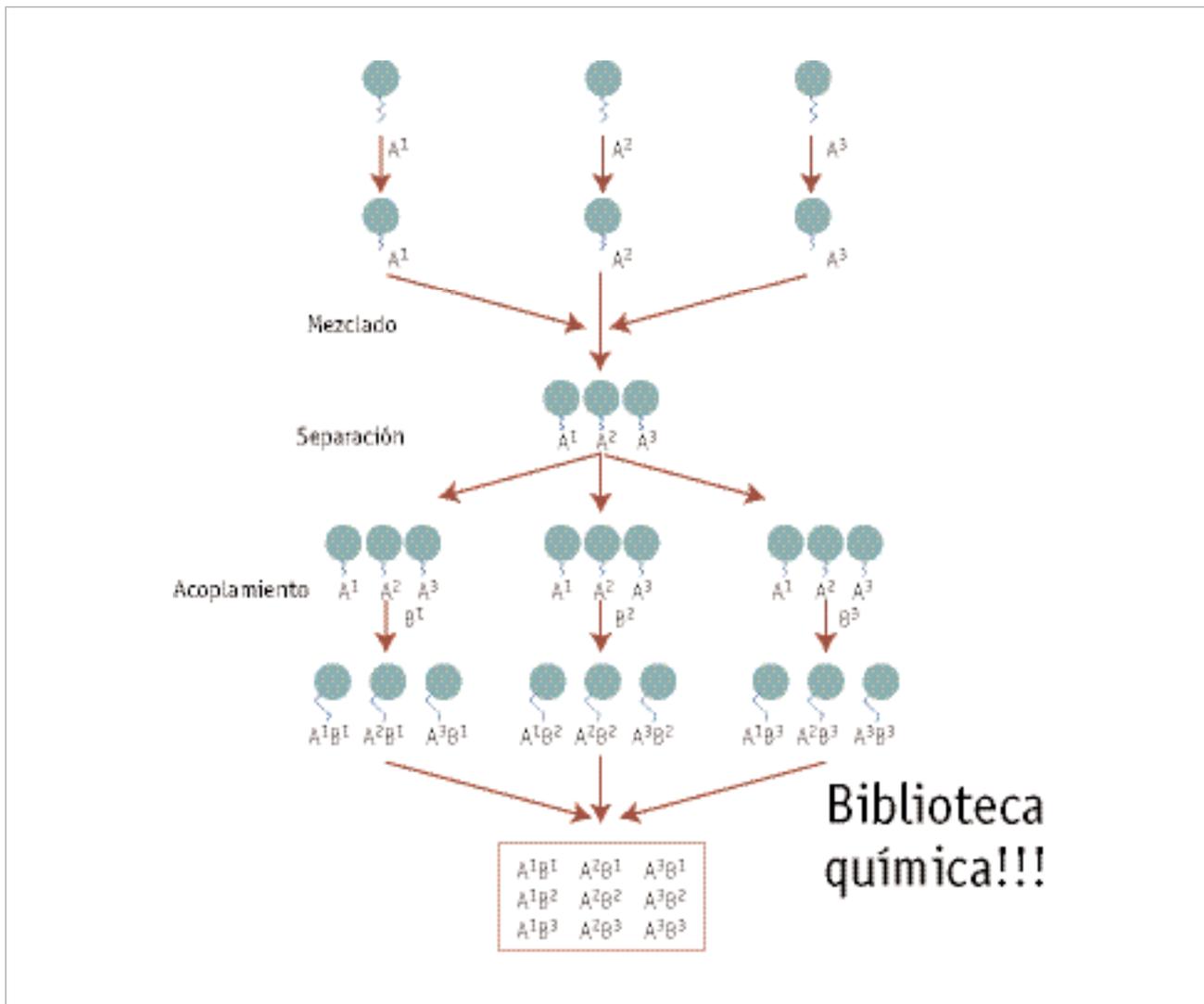


Figura 5. Técnica de “combinar y separar” de la química combinatoria.

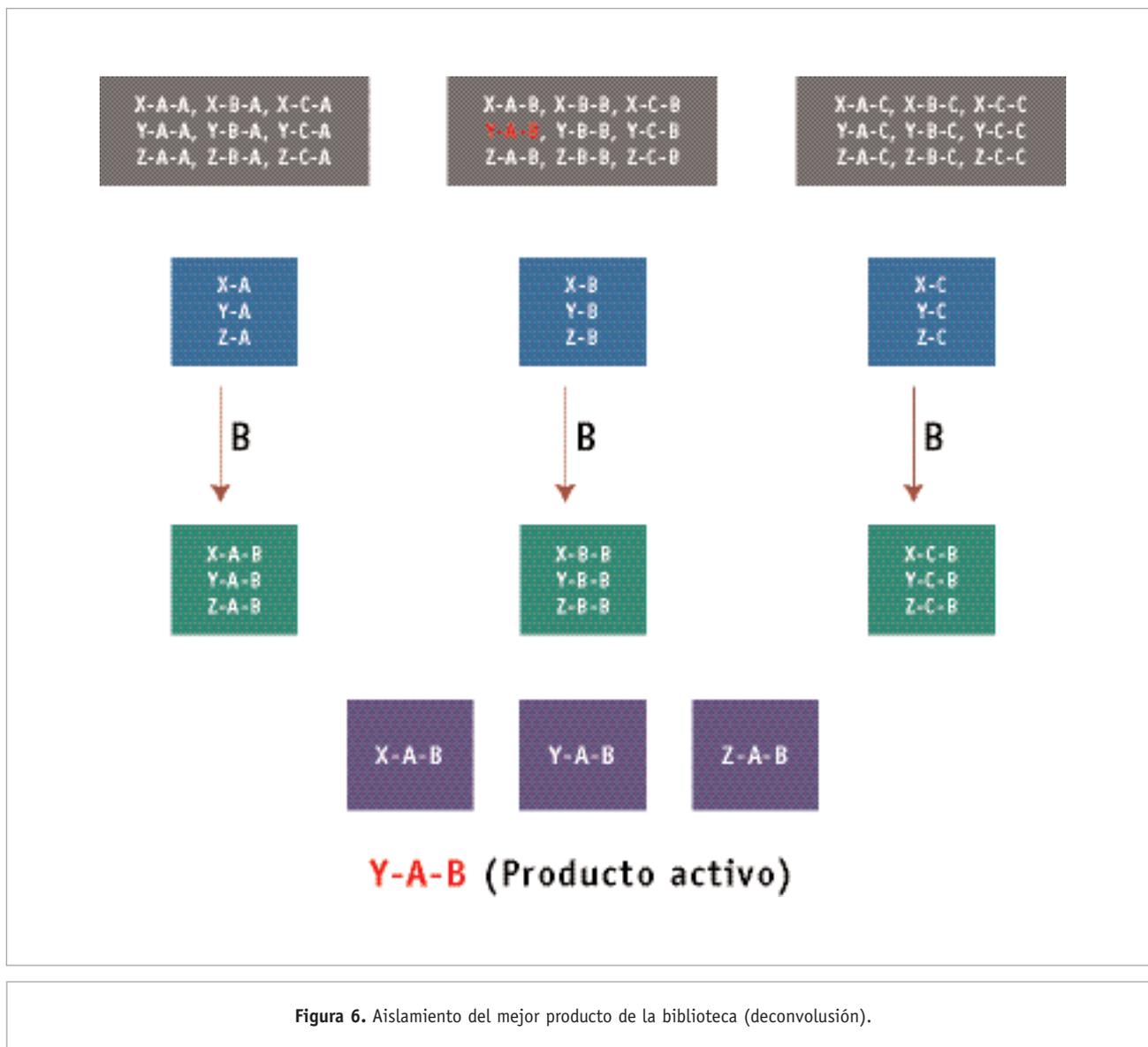
- *Codificación binaria*: consiste en marcar con compuestos conocidos, como la secuencia de péptidos, utilizando el uno por ciento del péptido como formato de marcaje. Se asigna un código binario a cada etiqueta individual. En la actualidad existen una amplia variedad de tipos de etiquetas, así como métodos de codificación y decodificación.

De esta forma, las industrias que requieren diferentes bibliotecas para realizar sus pruebas en ámbitos como el farmacéutico, petrolero, agroquímico, de procesos químicos (catalizadores), etcétera, podrán determinar el compuesto activo. En bibliotecas

muy grandes, es necesaria la identificación del compuesto; esto es bastante complicado, y para simplificarlo se utiliza algún tipo de etiqueta: con marcaje químico, electrónico, con radiofrecuencia, etcétera.

COSTOS DE PRODUCCIÓN

En la preparación de las bibliotecas se requiere una gran cantidad de reactivos análogos en cantidades muy pequeñas, debido a que las resinas son utilizadas en cantidades que varían



de 25 a 100 miligramos. Esto es un problema, ya que generalmente en el mercado existen industrias que venden reactivos en presentaciones de 1, 5, 10... kilogramos, etcétera. Como consecuencia, se tienen que adquirir volúmenes excesivos de reactivos.

SÍNTESIS DE MOLÉCULAS PEQUEÑAS

Un problema frecuente es el de proteger selectivamente uno de dos grupos funcionales en un compuesto. Frecuentemente se obtiene una mezcla de derivados, la cual debe ser separada

por métodos laboriosos. El aislamiento del producto no es necesario cuando se utiliza al soporte sólido como grupo protector; de esta manera sólo uno de los grupos funcionales puede ser protegido por inmovilización en el soporte. Este proceso es un ejemplo general del principio de “anzuelo”. Existen una gran cantidad de reacciones típicas de la química en solución que se han implementado en la fase sólida, como las que se muestran en el Cuadro 1.

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Uno de los puntos en investigación continua de la síntesis orgánica en fase sólida es que las técnicas tradicionales para mo-

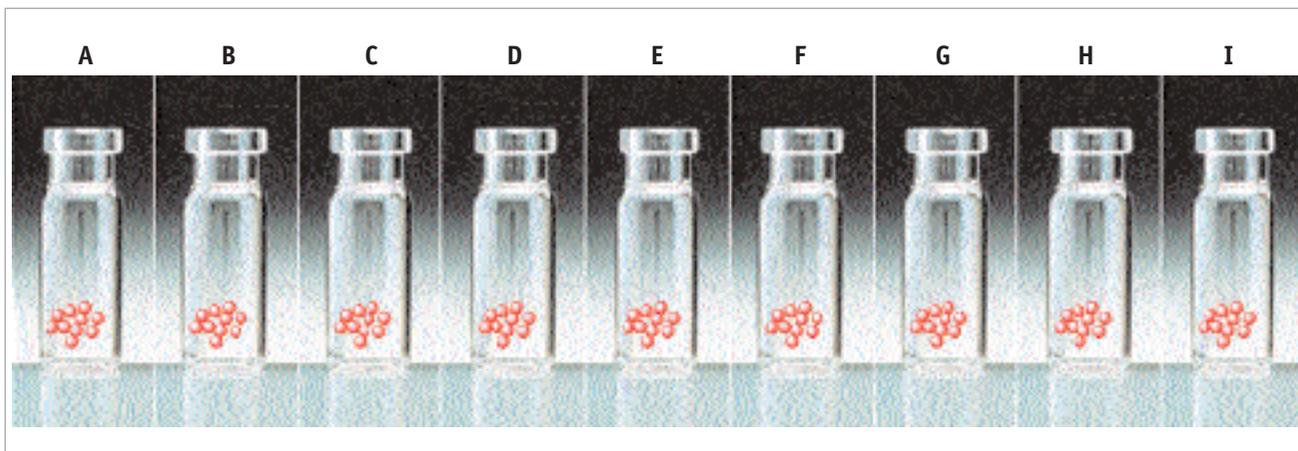


Figura 7. Biblioteca química.

nitorear una reacción —como cristalización, destilación, cromatografía, resonancia magnética nuclear, etcétera—, no se pueden aplicar a los compuestos soportados en fase sólida. Por tanto, se requieren métodos indirectos para evaluar el avance de las reacciones, como pruebas de color (ninhidrina), espectroscopías de infrarrojo, ultravioleta, fluorescencia, etc., o la liberación del compuesto para analizarlo en forma tradicional. Desafortunadamente, las técnicas analíticas no se han desarrollado lo suficiente, ya que generalmente el compuesto debe ser liberado de la resina por procesos químicos o fotoquímicos y posteriormente se caracterizó por métodos convencionales. Los métodos espectroscópicos de infrarrojo son técnicas común-

CUADRO 1.

Técnicas utilizadas en fase sólida

FORMACIÓN DE ENLACE C-C	REDUCCIÓN
1) Adición de Michael	1) Hidrogenación (baja presión)
2) Wittig	2) LiAlH_4
3) Horner-Emmons	3) Hidrosilación
4) Rearreglo de Claisen	4) Borano
5) Reacciones de Grignard	5) NaBH_4
FORMACIÓN DE ENLACE C-HETERO	OXIDACIÓN
1) Mitsunobu	1) Dess Martin
2) Sustitución Nucleofílica Aromática (SN)	2) AMCPB
3) Síntesis de Gabriel	3) Oxidación de Jones
4) Hidroboración	4) Baeyer Villiger
5) Amidas, ésteres, sulfonamidas	5) Dihidroxilación de Sharpless
6) Williamson (éter)	
7) Aminación Reductiva	

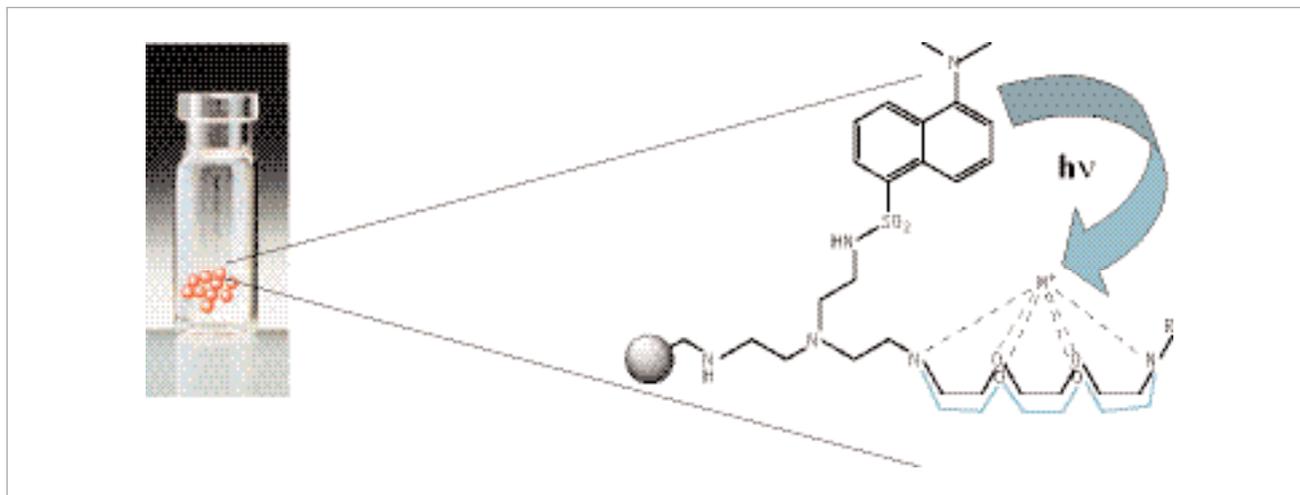


Figura 8. Biblioteca de sensores selectivos para iones, sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio.

mente usadas para detectar modificaciones en los grupos funcionales del compuesto soportado. Estos análisis son generalmente destructivos, y se requiere optimizar la preparación de la muestra.

¿CUÁL ES EL FUTURO DE LA QUÍMICA COMBINATORIA?

El constante desarrollo de la química combinatoria como metodología de búsqueda de nuevos materiales ha tenido un gran impacto en la actualidad. La síntesis orgánica en fase sólida, aunada a técnicas combinatorias, es una alternativa viable para la preparación de bibliotecas químicas. Con la diversidad de resinas y reactivos, y la adaptación de nuevas técnicas, es factible soportar y sintetizar sustancias con actividad biológica, como sensores químicos (Rivero, 2004; véase Figura 8), marcadores biológicos, catálisis. Esto ha despertado nuestro interés en explorar esta alternativa de síntesis y establecer esta metodología en nuestro laboratorio. Queda de manifiesto la enorme versatilidad de esta técnica y su factibilidad para implementarse en instituciones académicas.

Bibliografía

- Barany, G. y R. B. Merrifield (1979), *The peptides*, vol. 3, Gross, E. y Meienhofer J., Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-284.
- Furka y colaboradores (1991), "General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixture", *Int. J. Pept. Protein Res.* 37, 487-493.
- Geysen y colaboradores (1984), "Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3998-4002.
- Geysen y colaboradores (1987), "Strategies for epitope analysis using peptide synthesis", *J. Immunol. Methods*, 102(2), 259-274.
- Merrifield, R. B. (1963), "Solid Phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide", *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149-2154.
- Merrifield, R. B. (1985), "Solid phase synthesis (Nobel lecture)", *Angew. Chem.*, 24(10), 799-810.
- Rivero y colaboradores (2005), "Library preparation of derivatives of 1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diaza-cyclooctadecane and their fluorescence behavior for signaling purposes", *J. Comb. Chem.*, 7, 46-53
- Rivero y cols. (2004), "Fluorimetric monitoring of organic reactions on solid phase", *Jour. Comb. Chem.*, 6, 391-397.
- Smith, K. (1992), "Solid supports and catalysts in organic synthesis"; Ellis Horwood, Prentice Hall, Gran Bretaña.

Ignacio A. Rivero Espejel es profesor investigador de tiempo completo del Instituto Tecnológico de Tijuana desde 1983 hasta la fecha. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II y director del Centro de Graduados e Investigación en Química desde 1999. Recibió el grado de Maestro en Ciencias Químicas por el Instituto Tecnológico de Tijuana en 1986 y de Doctor en Ciencias Químicas en la misma institución en 1996. Realizó una estancia posdoctoral bajo la supervisión del doctor Charles Perrin, de la Universidad de la Jolla en San Diego, durante 1996-1997. Su área de interés es la síntesis orgánica en fase sólida y sus aplicaciones en la síntesis de compuestos heterociclos, sensores ópticos y péptidos.

irivero@tectijuana.mx

