



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Preparación y purificación de corrinas derivadas de B<sub>12</sub> para su posterior estudio de química de coordinación

Marina Bosch Picornell

**Grau de Química**

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Miquel Barceló Oliver

Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball: corrinas, biosíntesis, *Allochromatium vinosum*.



## Índice

Resumen .....	3
1. Introducción .....	4
2. Antecedentes.....	8
3. Objetivos.....	9
4. Seguridad.....	10
5. Procedimiento experimental.....	11
5.1 Material y reactivos .....	11
5.2 Obtención de bacterias púrpuras de azufre .....	12
5.2.1 Preparación de las disoluciones iniciales.....	12
5.2.2 Preparación del medio de cultivo.....	12
5.2.3 Procedimiento experimental.....	12
5.3 Extracción de células .....	13
5.3.1 Preparación de las disoluciones iniciales.....	13
5.3.2 Procedimiento experimental.....	13
5.4 Purificación por columna de separación .....	14
5.4.1 Preparación de las disoluciones iniciales.....	14
5.4.2 Procedimiento experimental.....	14
5.4.3 Columna de separación de JPM1.....	15
5.4.4 Columna de separación de JPM2.....	16
5.5 Caracterización química de los productos aislados.....	17
6. Resultados y discusión.....	18
6.1 Obtención de bacterias púrpuras de azufre .....	18
6.2 Purificación por columna de separación .....	18
6.2.1 Columna de JPM1.....	21
6.2.2 Columna de JPM2.....	24
7. Conclusión .....	26

## Resumen

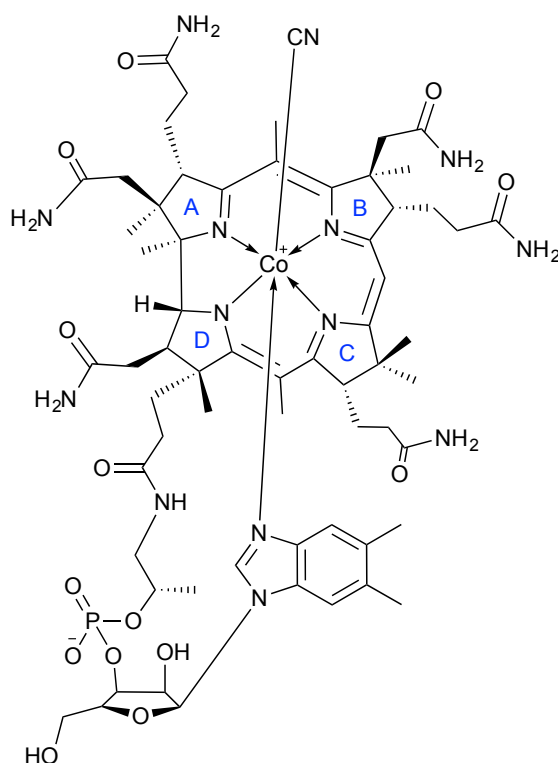
Se ha realizado el cultivo de *Allochromatium vinosum* para la posterior extracción de corrinoideos desmetalados. A continuación, con la purificación por columna, se ha conseguido la separación de la muestra en diferentes fracciones y su caracterización mediante espectrometría de masas. Se han obtenido ácido descobalto cobárico y descobalto cobalamina puros para su posterior uso en química de coordinación.

Siglas utilizadas: ACN (acetonitrilo) , LDL (*Lactobacillus Lactis Dorner*) y MS (espectrometría de masas).

## 1. Introducción

A mediados del siglo XIX, una enfermedad conocida como anemia perniciosa fue descrita por Thomas Addison, enfermedad inicialmente incurable hasta que en 1926 se comenzó a prescribir el consumo de hígado crudo para combatirla<sup>1</sup>. Esto provocó que su investigación quedara paralizada debido a la disminución de la presión social por la cura de los enfermos<sup>2</sup>. Se determinó que el consumo de hígado crudo favorecía el crecimiento de *Lactobacillus Lactis Dornier* (LLD), una bacteria cuyo déficit causaba dicha anemia. Posteriormente, en 1948, se consiguió aislar una sustancia roja a la que se denominó vitamina B<sub>12</sub>. El crecimiento de LLD se veía favorecido por la presencia de vitamina B<sub>12</sub> en el hígado crudo<sup>3</sup>.

A continuación se reveló que la vitamina B<sub>12</sub> presentaba en su estructura cianuro, un grupo pirrol, una parte nucleotídica y la existencia de cobalto<sup>2</sup>. Llevándose a cabo el aislamiento del producto cristalino, Dorothy Crowfoot-Hodking, en 1956, analizó mediante difracción de rayos X de monocristal la vitamina B<sub>12</sub> húmeda y también secada, llevándole ambas a la descripción de la estructura tal como se conoce hoy en día<sup>4</sup>.



**Ilustración 1.** Estructura de la vitamina B<sub>12</sub>, donde se observa el átomo de cobalto central rodeado de los cuatro anillos pirrólicos, en la posición 5 axial se observa el grupo 5,6-dimetilbencimidazol y en la posición 6 axial se observa un grupo ciano que caracteriza a la vitamina B<sub>12</sub> o cianocobalamina.

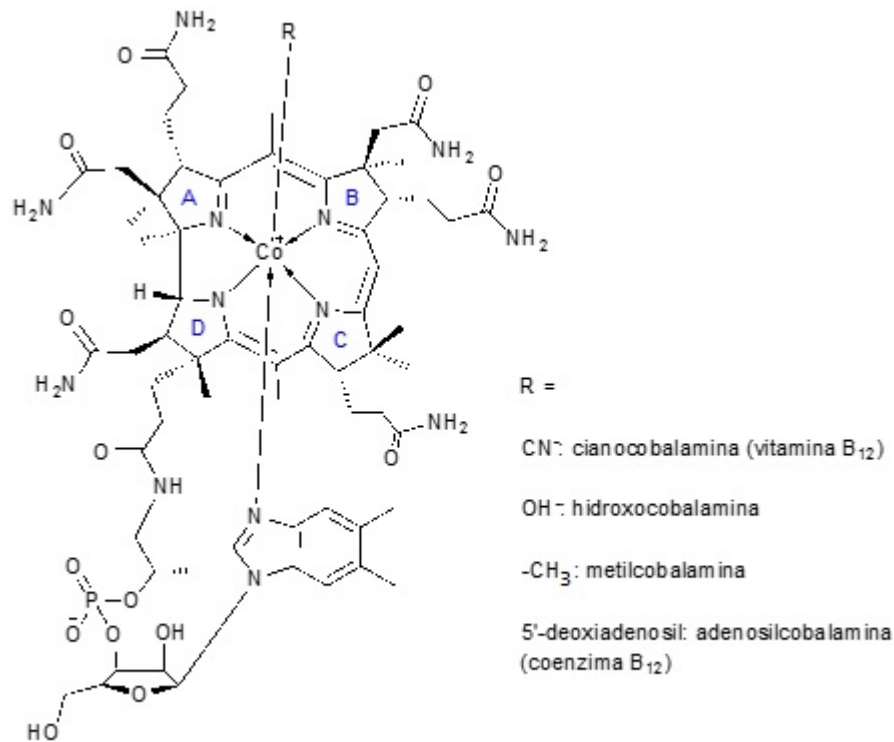
<sup>1</sup> J.H.Martens, H.Barg, M.J. Warren, D. Jahn, Appl Microbiol Biotechnol (2002) 58:275–285.

<sup>2</sup> J. Sergio Casas, V. Moreno, Á. Sánchez, J.L. Sánchez, J. Sordo. Química Bioinorgánica, Editorial Síntesis (2002).

<sup>3</sup> Muryel C.Caswell, Leah K.Koditschek, David Hendlin, J. Biol. Chem, (1949) 180:125-131.

<sup>4</sup> Dorothy Crowfoot Hodking, F.R.S., Jennifer Kamper, Maureen Mackay, Jenny Pickworth, Nature 178, 64-66 (1956).

La estructura de la vitamina B<sub>12</sub> (**Ilustración 1**) se basa en una corrina, que es la unión de cuatro anillos pirrólicos con un átomo de cobalto en el centro. Es también conocida como cianocobalamina debido a que presenta el grupo ciano en la posición 6 axial, la quinta posición (axial) se encuentra ocupada por un grupo 5,6-dimetilbencimidazol, en posición ecuatorial se encuentran los 4 enlaces que forma el cobalto con los nitrógenos del anillo de corrina.



**Ilustración 2.** Estructura de la familia de las cobalaminas en la que se observa en la posición 5 axial el grupo 5,6-dimetilbencimidazol y la posición 6 axial pudiendo ser R un grupo ciano (vitamina B<sub>12</sub>), hidroxocobalamina, metil (metilcobalamina) y 5'-deoxiadenosil (adenosilcobalamina).

La vitamina B<sub>12</sub> se demostró ser un artefacto producto del proceso de aislamiento. Una vez administrada es convertida en una de las formas activas, intercambiándose el sustituyente que ocupa la sexta posición de coordinación (grupo ciano) dando lugar a adenosilcobalamina, metilcobalamina e hidroxocobalamina<sup>2</sup>; por lo que se observaría la misma estructura que en la **Ilustración 2** siendo R un grupo 5'-deoxiadenosilo, un metilo y un grupo hidroxilo respectivamente.

Paralelamente, alrededor de 1959, Albert Barker trabajaba en una reacción de fermentación de glutamato para la que usaba extracto de bacilos como catalizador. De ella consiguió aislar un producto anaranjado que, al tratarse con CN<sup>-</sup> se transformaba en vitamina B<sub>12</sub>. Posteriormente, en 1962 Hodking resolvió la estructura, observando que se correspondía a la misma estructura que la vitamina B<sub>12</sub> pero que, en ella, se había intercambiado un grupo cianuro por un grupo 5'-desoxiadenosilo, originando un compuesto organometálico natural y por todo ello se le dio el nombre de coenzima B<sub>12</sub> o adenosilcobalamina<sup>2</sup> (**Ilustración 2**).

La coenzima se caracteriza por tener un enlace fotosensible  $\text{Co}^{\text{III}}\text{-C}$  de gran importancia, ya que puede evolucionar sustituyéndose el enlace anterior por  $\text{Co-OH}$  o  $\text{Co-OH}_2$ . Como bien dice Eschenmoser, la estructura molecular de una biomolécula es el resultado de procesos de selección biológica hacia la optimización de la función biológica de la molécula<sup>5</sup>. La coenzima  $\text{B}_{12}$  se caracteriza por ser el nucleófilo por excelencia, y cataliza procesos de isomerización donde se intercambia un hidrógeno unido a un carbono por otro grupo funcional unido a un carbono vecino (desplazamientos 1,2)<sup>6</sup>.

La síntesis total de la cobalamina fue descrita el año 1971 por Woodward-Eschenmoser, considerándose que se trata de la síntesis de una molécula con 9 carbonos quirales en la que son necesarios 70 pasos y que fue llevada a cabo por unas 100 personas en 11 años de trabajo<sup>7</sup>, puede entenderse la dificultad de dicha síntesis. A modo de resumen destacar que la síntesis total se realizó sin tener en cuenta la “cola” (sustituyente de la posición 5 axial en la vitamina  $\text{B}_{12}$ ) puesto que en 1960 Bernhauer demostró que ésta podía eliminarse dando lugar al ácido cobárico y reintroducirse<sup>8</sup>; entonces quedaría por sintetizar una estructura, la corrina, formada por 4 anillos pirrólicos, numerados A, B, C y D, para lo cual se debía realizar la síntesis del anillo A, seguida de la síntesis del anillo D y un posterior acoplamiento de dichos anillos, así como una posterior síntesis de los anillos C y D, seguidos de su acoplamiento y finalmente el acoplamiento de AD y BC<sup>9</sup> (**Ilustración 3**). También se describió la variante en la que se iniciaba el acoplamiento AB, seguido del acoplamiento de CD con un posterior acoplamiento de AB y CD. Por todo ello, dada la alta complejidad del proceso sintético, es más viable la biosíntesis a partir de bacterias y arqueas que contienen las enzimas necesarias para producir dicha molécula; de hecho, a nivel industrial la vitamina  $\text{B}_{12}$  se produce mediante la fermentación de microorganismos como *Pseudomonas denitrificans* y *Propionibacterium shermanii*<sup>10</sup>.

Durante los estudios sintéticos se constató además que el átomo de cobalto central no podía eliminarse de la vitamina  $\text{B}_{12}$  sin destruir el anillo de corrina<sup>11</sup> y, además, es necesario para cerrar el anillo de corrina, pues lleva a cabo un efecto plantilla (template) en el acoplamiento de los fragmentos AD y BC.

---

<sup>5</sup> Albert Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988), 5-39.

<sup>6</sup> J. Sergio Casas, V. Moreno, Á. Sánchez, J.L. Sánchez, J. Sordo. *Química Bioinorgánica*, Editorial Síntesis (2002).

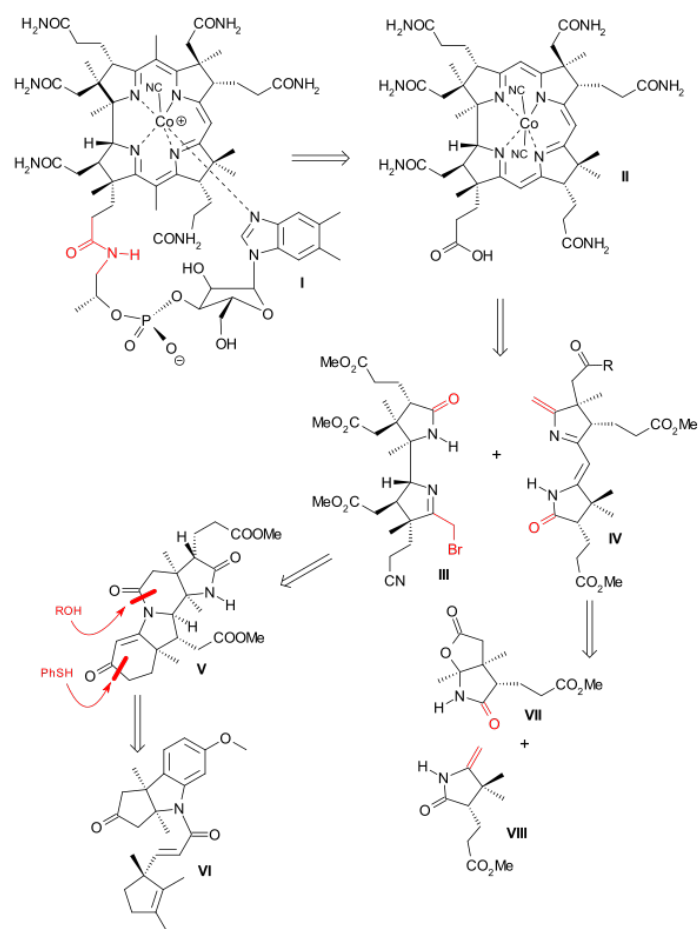
<sup>7</sup> Khan, Adil Ghani, Eswaran S.V. *Resonance* Vol. 8 (No. 6): 8-16 (2003).

<sup>8</sup> F.W. Gross, G. Bernhauer, K. Zeller, *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 43, 704-712 (1960).

<sup>9</sup> R.B. Woodward, *Pure Appl. Chem*, Vol. 17, 519-547 (1968).

<sup>10</sup> J.-H. Martens, H. Barg, M.J. Warren, D. Jahn, *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 58:275–285, DOI 10.1007/s00253-001-0902-7.

<sup>11</sup> J.I. Toohey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 934-942 (1965)



**Ilustración 3.** Esquema retrosintético de la vitamina B12. I) vitamina B12; II) ácido cobárico<sup>12</sup>.

Más adelante se descubrió que determinados tipos de bacterias fotosintéticas eran capaces de sintetizar por sí solas y de manera natural derivados de la vitamina B<sub>12</sub> sin el átomo de cobalto, llamándose a estos compuestos descobaltocobalaminas; esto podía realizarse utilizando un medio de cultivo con déficit de cobalto e incluso en algunas bacterias se producía sin dicho déficit en el medio, en ambos casos controlando el pH<sup>13</sup>. Las corrinas sin cobalto podían obtenerse de *Allochromatium vinosum*, que es un tipo de bacteria púrpura de azufre, así como de *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris*, ambas bacterias púrpuras sin azufre<sup>14</sup>.

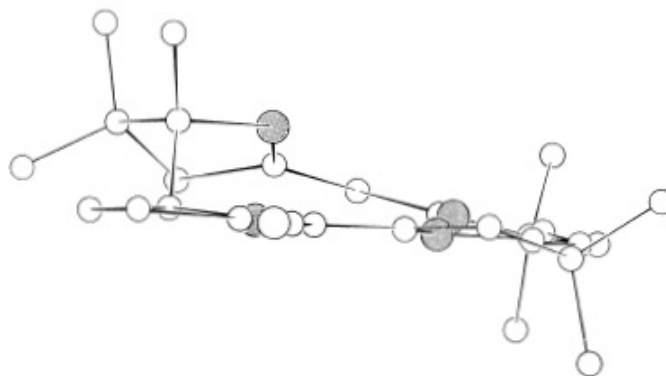
<sup>12</sup> User:Dissolution/ Wikimedia Commons/ CC-BY-SA-3.0

<sup>13</sup> J.I. Toohey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 934-942 (1965)

<sup>14</sup> J.I. Toohey, *Fed. Proc.* 25, 1628-1632(1966)

## 2. Antecedentes

La *Allochromatium vinosum* es una bacteria púrpura de azufre, anaeróbica, que crece adecuadamente en un rango de temperaturas entre 25-35°C y pH entre 7,0-7,3 respectivamente, en un medio de cultivo que puede contener un déficit de cobalto. En presencia de luz y sulfuro se da lugar a una fosforilación fotosintética y a la generación de ATP necesario para su posterior biosíntesis<sup>15,16</sup> obteniéndose generalmente 2 gramos de células (packed cells) por litro de cultivo. Entonces, si el medio de cultivo utilizado es el descrito por Arnon *et.al.* se obtienen fenilhidrogenocobamida y ácido hidrogenocobárico; si para el crecimiento se le añade 5,6-dimetilbencimidazol al medio, se obtiene  $\alpha$ -(5,6-dimetilbencimidazol)-hidrogenobamida<sup>17</sup>. Koppenhagen demostró que al bromhidrato de 1,2,2,7,7,12,12-heptametil-15-cian-corrina (**Ilustración 4**) podían añadirse cobalto, níquel, paladio, rodio y zinc<sup>18,19,20</sup>, debido al efecto macrociclo, que es un proceso de coordinación dado entre un centro metálico y una estructura cíclica con 3 o más átomos dadores, que en el caso dado sería la corrina; aunque estas estructuras no se encuentran bien caracterizadas. Por lo que el interés de las descobaltocorrinas se debe a que puede adicionarse un metal de transición como ya se ha hecho con cobre, zinc y rodio. Los productos derivados de descobaltocobalaminas coordinados a metales de transición son de especial interés debido a que se demostró su actividad como antimetabolitos de la vitamina B<sub>12</sub>, impidiendo el crecimiento de *Lactobacillus leichmannii* y *Escherichia Coli* (este último únicamente impedido por derivados del rodio), resultando entonces útiles como antibióticos.



**Ilustración 4.** Reproducción de 1,2,2,7,7,12,12-heptametil-15-cian-corrina realizada por Eschenmoser<sup>21</sup>.

<sup>15</sup> T. Weissgerber *et. al.*, *Standards in Genomic Sciences*, 5:311-330 (2011).

<sup>16</sup> D.I. Arnon, V.S.R. Das, J.D. Anderson, *Microalgae & Photosynthetic Bacteria*, 529-545 (1963).

<sup>17</sup> V.B. Koppenhagen, F. Wagner, J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.*, 249, 6532-6540 (1974).

<sup>18</sup> V.B. Koppenhagen, F. Wagner, J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.*, 249, 6532-6540 (1974).

<sup>19</sup> V.B. Koppenhagen, J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* 246, 3075-3077 (1971).

<sup>20</sup> V.B. Koppenhagen, F. Wagner, J.J. Pfiffner, *J. Biol. Chem.* 248, 7999-8002 (1973).

<sup>21</sup> A. Eschenmoser, *Quart. Rec. Chem. Soc.*, Londres 24, 366 (1970).



### 3. Objetivos

Los objetivos perseguidos en este trabajo son los siguientes:

1.- Aislar derivados de cobalamina, sin el átomo metálico central, para su posterior uso en química de coordinación:

1.1.- Realizar la biosíntesis de los citados derivados mediante cultivo de *Allochromatium vinosum*.

1.2.- Separar y purificar los corrinoïdes obtenidos.

1.3.- Llevar a cabo la caracterización química completa de los compuestos preparados.

2.- Estudiar la química de coordinación de las corrinas obtenidas con metales en estado de oxidación formal +3.

3.- Determinación de las posibles aplicaciones de los nuevos compuestos preparados, por ejemplo, como posibles antibióticos, gracias a la interacción sobre el riboswitch de B<sub>12</sub>.

## 4. Seguridad

- Para trabajar con acetonitrilo es necesario trabajar con guantes de látex. En caso de estar utilizando guantes de nitrilo en ese momento será fundamental realizar el cambio puesto que estos pueden ser destruidos por el disolvente.
- Todos los líquidos residuales del cultivo de bacterias deben ser desactivados antes de su eliminación. Para ello, deben autoclavarse durante 30 minutos a 121°C o, alternativamente, deben ser tratados con lejía doméstica diluída 1:10 durante 30 minutos previamente a su eliminación por el desagüe.

## 5. Procedimiento experimental

### 5.1 Material y reactivos

Los reactivos usados se adquirieron de Merck, Sigma, Scharlau, Panreac, Alfa Aesar, VWR Chemicals y Fluka de calidad p.a. o superior y se utilizaron sin una purificación previa. El vial de *Allochromatium vinosum* (DSM 180) se adquirió en el repositorio Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, de Braunschweig (Alemania).

Para la esterilización por autoclavado de las disoluciones se utilizó un autoclave de la marca J.P. Selecta modelo Presoclave III 80, habitualmente a 121°C durante 30 minutos.

Para la esterilización se utilizaron filtros de 0,22µm.

Toda el agua utilizada tiene que ser ultrapura, de calidad tipo I, es decir, Milli-Q o similar.

Para la incubación de las bacterias púrpuras de azufre se utilizó una cámara de cultivo fototrópica de la marca Binder y modelo KBW400 90020-0180 con luz diurna a partir de tubos Osram Lumilux Cool Daylight con una potencia de 24 W/m<sup>2</sup> o 9000 lx. En la incubación de bacterias la incubadora se mantuvo a 30°±1°C durante 72±2 horas.

Para la centrifugación de muestras se usó una centrífuga refrigerada 5810R con rotor F45-6-30 (ángulo fijo, 45° para los tubos de centrífuga de 50 ml tipo Falcon®) y rotor S-4-104 (oscilante, para botellas de 750 ml o tubos de 15 y 50 ml).

Para concentrar las muestras se hizo mediante el rotavapor de la marca Buchi Switzerland con una bomba de vacío V-300, rotavapor R-300, interfase I-300 y refrigerador de recirculación F-305, todo de la misma marca. Al rotavaporar la muestra se operó en condiciones de presión de 93 atm y baño de agua a 50°C.

Para concentrar las muestras posteriormente a la realización de la columna, las muestras se introdujeron en tubos Eppendorf de 2 ml y se evaporaron en el Concentrador Plus de la marca Eppendorf.

El liofilizador utilizado para la concentración de las muestras fue el modelo Advantage de la marca Virtis.

La espectroscopia de masas de alta resolución (HRMS) se llevó a cabo con un equipo Q Exactive de Thermo Scientific, usando ionización por electroesprai (ESI).

Para simplificación se han ordenado los reactivos y materiales en los distintos apartados en los que se divide el procedimiento experimental, asimismo en este mismo apartado se han incluido disoluciones que son comunes en esos apartados.

## 5.2 Obtención de bacterias púrpuras de azufre

### 5.2.1 Preparación de las disoluciones iniciales

- HCl - 6N: en campana de gases se diluyen 500 ml de HCl comercial del 37% hasta 1 litro con agua.
- NaOH - 5M: se disuelven 100 g de NaOH comercial en agua hasta volumen final de 500 ml.
- Ácido málico - 1,2 M, pH=7: se disuelven 161 g de ácido málico comercial en agua, se ajusta el pH a 7 con NaOH 5M recién preparada y se ajusta el volumen a 1 l.
- Solution III (E7): se disuelven los siguientes reactivos en agua, se ajusta el volumen final a 1 litro: 2,86 g  $H_3BO_3$ , 1,48 g  $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,222g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,079 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,1446 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0,023 g  $NH_4VO_3$  y 0,0494 g  $Ca(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ .
- $Fe^{III}$ -AEDT: inicialmente se preparan dos disoluciones: a) 4 g de  $H_4$ (AEDT) comercial y 2,65 g de KOH en 46,5 ml de agua; b) 3,43 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en 91 ml de agua. Las dos disoluciones se mezclan y se introducen en un frasco lavador conectado a un segundo frasco lavador vacío que actúa como trampa de seguridad y a una bomba de aire. Se lleva a cabo un paso de aire durante una noche para la obtención del complejo de AEDT con  $Fe(III)$ .
- NaCl - 0,9 %: se disuelven 9 g de NaCl comercial en agua, se ajusta el volumen final a 1 l y se autoclava.
- Solution I: se disuelven los siguientes reactivos en 1200 ml de agua en una botella de 2 litros de capacidad: 7,02 g NaCl, 1,61 g  $NH_4Cl$ , 0,55 g  $KH_2PO_4$ , 0,98-1,00 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,146 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 20 ml HCl 6N, 20 ml ácido málico 161 g/l pH=7, 2 ml Solution III, 1,6 ml  $Fe^{III}$ -AEDT. Posteriormente la disolución se autoclava y almacena a 4°C durante un máximo de 4 días.
- Solution II: se disuelven los siguientes reactivos en un volumen final de 900 ml en una botella de 1 litro de capacidad: 24,94 g  $Na_2CO_3$  y 0,115 g  $Na_2S \cdot 2H_2O$ . La disolución se autoclava y almacena en nevera a 4°C en un período máximo de 4 días.

### 5.2.2 Preparación del medio de cultivo.

A temperatura ambiente se introducen 600 ml de Solution II en la botella que contiene 1200 ml de Solution I, se ajusta el pH a 7,6 y se enrasa con agua autoclavada hasta 2000 ml.

### 5.2.3 Procedimiento experimental

Se preparan 9 litros de medio de cultivo como se indica en el apartado 5.2.2 y se introducen en botellas de cultivo de vidrio de borosilicato transparente con tapón esmerilado (este material previamente ha sido autoclavado). A cada botella se adicionan 25 mg de 5,6-

dimetilbencimidazol del 99% y se inoculan 40 ml del cultivo anterior<sup>22</sup> que se encuentra en el incubador en cada botella. Se elimina el oxígeno mediante el burbujeo de nitrógeno, se tapan las botellas y se incuban 72 horas a 30°C con luz diurna continua.

Pasadas las 72 horas el contenido de las botellas se centrifuga a 3214 g a 4°C durante 15 minutos. A partir de este momento se trabaja en frío; una vez centrifugado todo el contenido de las botellas, las pellets se resuspenden con una disolución acuosa de NaCl del 0,9%. Una vez resuspendida la muestra ésta se introduce en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad y se centrifuga (3214 g, 15 minutos, 4°C) hasta terminar las existencias. La pellet (packed cells) finalmente se pesa (15,6 gramos de media) y congela a -20°C para su posterior purificación por columna.

El procedimiento habitual es preparar 4 botellas de 2,2 l al día, 3 días a la semana.

### 5.3 Extracción de células

#### 5.3.1 Preparación de las disoluciones iniciales

- Disolución de etanol al 90% y ácido acético 0,2%: se miden 937,5 ml de etanol 96° y 2 ml de ácido acético comercial, se diluye hasta un volumen final de 1 litro con agua autoclavada.

#### 5.3.2 Procedimiento experimental

Una vez se han obtenido 200 gramos de producto, equivalentes a 10 tubos Falcon de los anteriores, puede prepararse la muestra introduciendo 25 ml de la disolución al 90% en etanol y 0,2% en ácido acético, trabajando en ausencia de luz. Se aplica el vórtex a los diferentes tubos hasta que se haya conseguido resuspender toda la muestra, quedando el contenido con una coloración marrón oscura. Posteriormente la mezcla se centrifuga (3214 g a 4°C durante 15 minutos), quedando la porción líquida de color azul claro y se rotavapora para eliminar el etanol. Una vez la muestra está concentrada, en continua agitación se lleva a pH=3, se introduce en un Falcon de 50 ml y se centrifuga 5 minutos bajo las mismas condiciones. El sobrenadante queda de color anaranjado, se introduce en un vaso de precipitados y se neutraliza hasta pH=7. Se congela con nitrógeno líquido y se liofiliza en ausencia de luz a -50°C hasta que presenta un aspecto sólido amarillo-anaranjado.

---

<sup>22</sup> No se indica como se realiza la obtención inicial del cultivo, a partir del vial obtenido del DSMZ, por escaparse del objetivo de esta memoria de TFG.

## 5.4 Purificación por columna de separación

### 5.4.1 Preparación de las disoluciones iniciales

- Disolución acetonitrilo 90%: se introducen 900 ml de acetonitrilo comercial y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua autoclavada.
- Disoluciones de acetonitrilo/agua al 2,5%; 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%; 22,5%; 25%; 27,5%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55% y 60%.

### 5.4.2 Procedimiento experimental

Posteriormente al cultivo de la bacteria púrpura de azufre se obtiene una combinación de productos que debe separarse. Para ello se realiza una columna cromatográfica sólido-líquido, en fase inversa y en gradiente<sup>18,19,20,21</sup>. Para lo que se usa sílica gel C18-RP y una fase móvil que consiste en disoluciones de acetonitrilo y agua en diferente proporción. Las referencias bibliográficas utilizadas hacían referencia al uso de Amberlite XAD-2 en lugar de C18-RP.

Para realizar la columna de separación se introduce lana de vidrio en una columna de vidrio de 1 cm de diámetro y se dispone lo más homogéneamente posible. Una vez la lana de vidrio está convenientemente colocada, se pesan 3 gramos de sílica C18-RP y se suspenden en aproximadamente 20 ml de acetonitrilo. A continuación la suspensión se introduce en la columna lo más rápidamente posible, se deja reposar durante una hora y media, consiguiéndose que se deposite. Transcurrido ese tiempo se elimina lentamente el disolvente hasta que quede disolvente hasta a un centímetro por encima de la sílice. La columna, una vez empaquetada, se prepara con 15 ml de acetonitrilo 90% y finalmente con 60 ml de agua autoclavada.

La muestra, una vez liofilizada, se resuspende en 25 ml de agua autoclavada, se centrifuga a 1000 g y 4°C durante 5 minutos, obteniéndose la muestra lista para ser introducida en la columna.

Se introduce la muestra y se observa como ésta se deposita en la sílice por lo que puede comenzarse la separación; por lo que se cierra el sistema y se conecta una bomba de aire que ayudará a conseguir una mayor velocidad de separación.

Para la separación de la muestra se realiza un gradiente de concentración de acetonitrilo, desde 0% hasta 30%. En primer lugar se introducen 35 ml de agua autoclavada y a continuación se inicia el gradiente de acetonitrilo: se introducen 65 ml de la disolución de ACN 2,5%, posteriormente 55 ml de ACN 5%, 80 ml de ACN 10%, 30 ml ACN 15% y se recoge la disolución que tiene un coloración rosada en un tubo de ensayo, a esta porción se la denominará JPM2. Seguidamente se introducen 20 ml de ACN 20% y 20 ml de ACN 30% y se recoge medio tubo de ensayo de una disolución con una coloración rojiza de JPM1. Se hacen pasar 10 ml de ACN 90% y 60 ml de agua autoclavada para lavar la columna.

Se realiza un análisis mediante espectrometría de masas de las muestras y posteriormente, cuando han sido realizadas 8 columnas de este tipo, se procede a preparar dos columnas nuevas, una para la separación de la fracción JPM1 y otra para la separación de la fracción JPM2, puesto que se sospecha que son mezclas de diferentes compuestos.



*Ilustración 5. Imagen de la fracción JPM1, que presenta una coloración rojiza cuando es recogida.*

#### 5.4.3 Columna de separación de JPM1.

Para la separación de la fracción JPM1 se prepara una columna de sílice C18-RP del mismo modo que en el apartado 5.4.2 y en ausencia de luz para no dañar la muestra. Una vez la columna esta lista para su uso, 8 muestras que fueron obtenidas de 8 columnas anteriores, se disuelven en la mínima cantidad necesaria de agua autoclavada, obteniéndose una muestra que presenta un color rojizo que se introduce en la columna.

Puesto que esta muestra eluyó con ACN al 30% en la anterior columna, se selecciona trabajar en un gradiente de ACN 10% hasta 27,5%. Se introducen 100 ml de ACN al 10% y se recogen 30 ml de la muestra 1.1. que presenta un color rosa palo. A continuación se hacen pasar 50 ml ACN al 12,5%, aunque no se produce ninguna separación, por lo que se hacen pasar 50 ml de ACN al 15%, se observa la ligera separación de 3 franjas. Para favorecer la separación se pasan 50 ml de la disolución al 12,5% y seguidamente 30 ml de la disolución al 10%, aunque al no observarse la completa separación de las bandas, se introducen 100 ml de la disolución al 12,5% y seguidamente 150 ml de ACN al 15% al no observarse una gran diferencia. A continuación se pasan 50 ml de la disolución de ACN al 20% y se observa un aumento de la separación de las franjas; se añaden 25 ml de la disolución al 20% momento en que comienza a salir una de las franjas, se introducen 25 ml de ACN al 22,5% y finalmente

se recogen 75 ml aproximadamente de la muestra 1.2., que presenta una coloración variada anaranjada. Después se hacen pasar 50 ml de ACN al 25 %, recogiendo aproximadamente 26 ml de 1.3.G. con una coloración amarilla. Se observa una franja de coloración naranja intenso, recogiendo 26 ml de muestra 1.4. Finalmente se hacen pasar 75 ml de ACN al 27,5% se recolectan 21 ml de muestra 1.5.G. con una coloración amarilla. Para dar fin a la columna se introducen 30-40 ml de ACN al 90% y posteriormente la misma cantidad en agua.

<b>Muestra</b>	<b>Coloración</b>	<b>Volumen recogido (ml)</b>
<b>1.1.</b>	Rosa palo	30
<b>1.2.</b>	Naranja-Rosa	75
<b>1.3.G.</b>	Amarillo	26
<b>1.4.</b>	Anaranjado	26
<b>1.5.G.</b>	Amarillo	21

*Tabla 1. Tabla resumen en la que se muestran las diferentes fracciones obtenidas por purificación de la muestra JPM1, la coloración presentada y la cantidad recogida en unidades milimétricas.*

Las muestras se introducen en Eppendorf de 2 ml y se concentran en el concentrador hasta haber eliminado completamente el disolvente (8 días). Llegados a este punto, las muestras están listas para ser analizadas, aunque solo se analizarán las de coloración anaranjada puesto que las amarillas son productos de degradación.

#### 5.4.4 Columna de separación de JPM2.

Para la separación de JPM2 se prepara una columna de sílica C18-RP del mismo modo que se realiza en el apartado 5.4.2 y en ausencia de luz. Una vez se tiene la columna lista, se disuelve la muestra de 8 columnas anteriores con la mínima cantidad de agua autoclavada (1,5 ml), se resuspende con ayuda del Vórtex y se observa una disolución amarilla. Se introduce lo más rápidamente posible en la columna y se cierra el sistema.

Se decide trabajar en un gradiente de 0% hasta 17,5% por lo que se introducen 200 ml de agua autoclavada, seguidamente 300 ml de disolución de ACN al 2,5%, se observa como comienzan a separarse las bandas y se recogen 45 ml de 2.1.G de color amarillo. Posteriormente se hacen pasar 85 ml de ACN al 5%, se recolectan 24 ml de 2.2.G. de color amarillo más intenso. Seguidamente se introducen 150 ml de ACN al 7,5% y se recogen 24 ml aproximados de 2.3.R., que presenta un color rosado. Se añaden 140 ml de disolución de ACN al 10% y se consiguen 28 ml aproximadamente de 2.4. de una coloración rosada más intensa. Se hacen pasar 30 ml de disolución al 12,5% , 25 ml de disolución al 15% y se agrupan 35 ml de muestra 2.5. de color rosa. Se hacen pasar 15 ml de disolución de ACN al 17,5% y se obtienen unos 15 ml de 2.6.G. de color amarillo intenso. Finalmente se introducen 30-40 ml de disolución al 20%, recogiendo 35 ml de 2.7. coloración rosada y se lava la columna con 30-40 ml de ACN al 90% y la misma cantidad de agua.



<b>Muestra</b>	<b>Coloración</b>	<b>Volumen recogido (ml)</b>
<b>2.1.G.</b>	Amarillo	45
<b>2.2.G.</b>	Am. Intenso	24
<b>2.3.R.</b>	Ligeramente rosado	24
<b>2.4.</b>	Rosado	28
<b>2.5.</b>	Rosa intenso	35
<b>2.6.G.</b>	Am. intenso	15
<b>2.7.</b>	Rosado	35

*Tabla 2. Tabla resumen de las diferentes fracciones recogidas en la purificación de la fracción JPM2, en la que se recoge el nombre dado a cada muestra, la coloración que esta presenta y el volumen recogido en unidades milimétricas.*

Las muestras se introducen en tubos de microcentrífuga Eppendorf de 2 ml y se concentran en el concentrador hasta haber eliminado completamente el disolvente. Llegados a este punto las muestras están listas para ser analizadas, aunque sólo se analizarán las de coloración rosada puesto que las amarillas son productos de degradación.

#### 5.5 Caracterización química de los productos aislados.

El posterior análisis de las diferentes fracciones se realiza mediante espectrometría de masas molecular de alta resolución, el mecanismo de análisis es el bombardeo de electrones a la muestra en estado gas, generándose iones radicales, estos pasan por la rendija del espectro de masas ordenándose en relación masa/carga para originar un espectro de masas, relacionando la intensidad de cada pico con respecto a su relación masa-carga. Al pico más alto se le denomina pico base y, asignándole una abundancia relativa de 100, se ajustan el resto de picos respecto de este<sup>23</sup>.

---

<sup>23</sup> Skoog, Holler, Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, Quinta Edición, Mc Graw Hill, Madrid (2001).

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Obtención de bacterias púrpuras de azufre

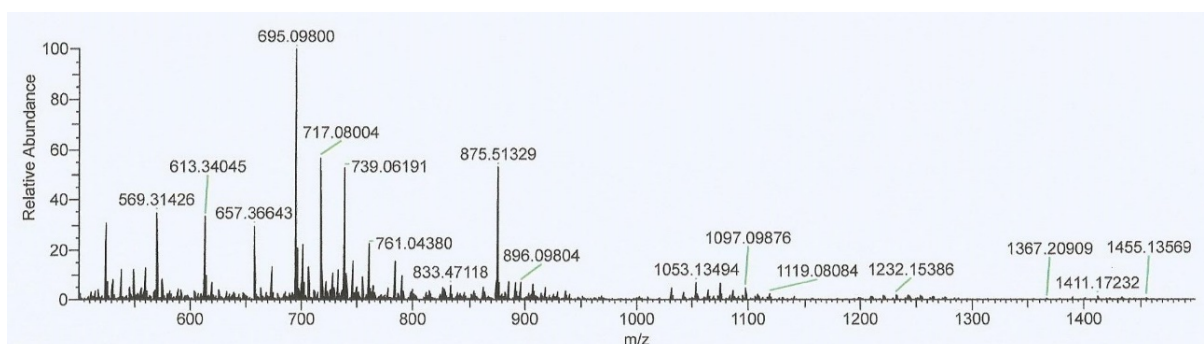
Según bibliografía a partir de *Allochrochromatium vinosum* se obtienen 2 g/l de *packed cells*, habiéndose obtenido en nuestro caso una media de 15,67 gramos de muestra por cultivo y debido a que cada cultivo consta de 8,8 litros, llegamos a la conclusión que de media se han obtenido 1,78 g/l. Esta cantidad es ligeramente menor a la esperada, hecho que no puede atribuirse a ningún factor concreto debido a que en la incubación son relevantes múltiples factores.

### 6.2 Purificación por columna de separación

Según las fuentes en que se ha basado para este trabajo de investigación, de *Allochrochromatium vinosum* se espera la purificación y separación de ácido descobaltocobárico y de descobalto cobalamina.

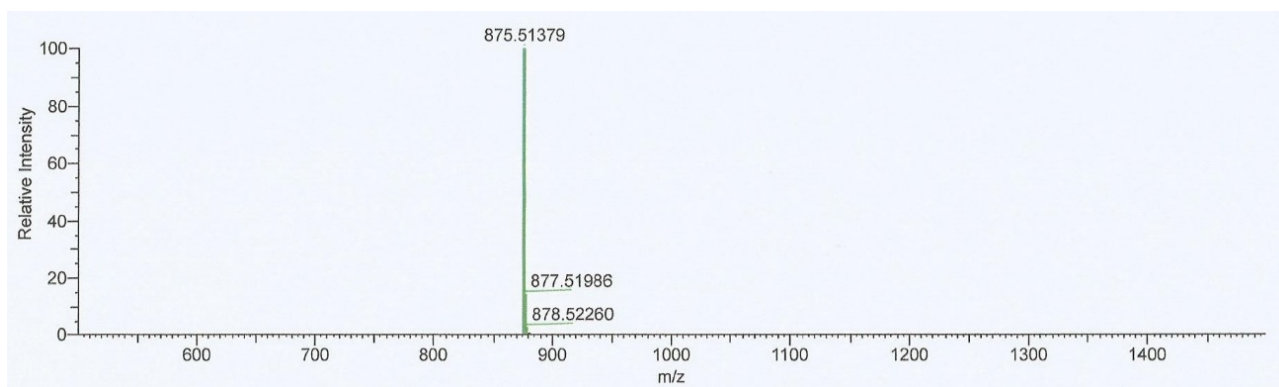
Tras la realización de una columna de separación se procedió al análisis mediante espectrometría de masas molecular de las fracciones JPM1 y JPM2.

La muestra JPM2 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) presentó el siguiente resultado:



**Ilustración 6.** Espectro de masas de la muestra JPM2.

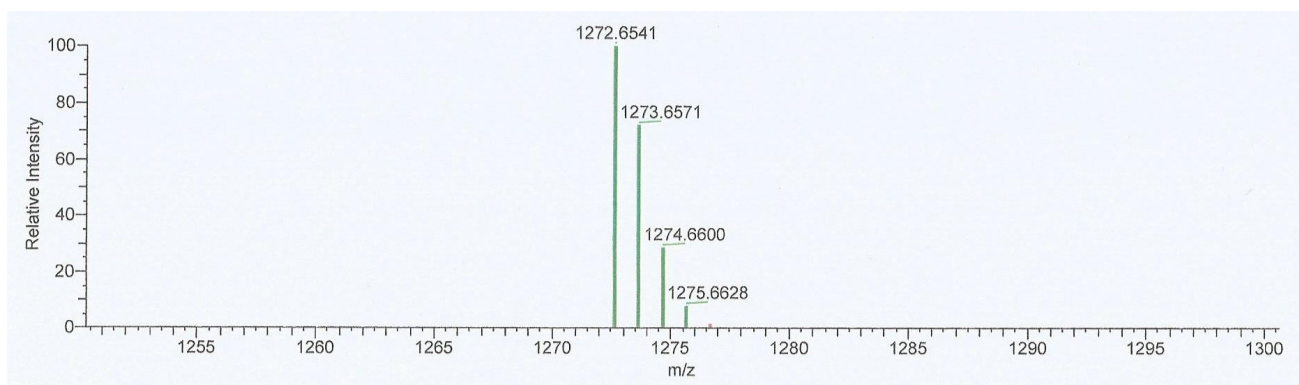
Observando la MS de la muestra se observan multitud de picos, según la literatura se esperaba que fuera ácido descobalto cobárico, cuyo patrón característico es el que sigue (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**):



**Ilustración 7.** Patrón isotópico del ácido descobalto cobérico.

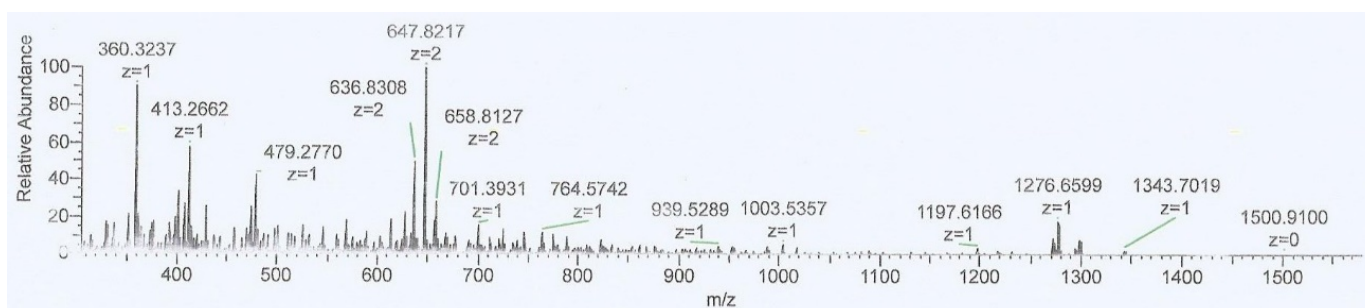
Si comparamos la **Ilustración 6** y la **Ilustración 7**, observamos que el pico molecular a 875,51 m/z del ácido descobalto cobérico está presente en JPM2; pero el resto de picos no pueden explicarse. Puede suponerse entonces que la muestra contiene ácido descobalto cobérico pero que, en realidad, se trata de una mezcla de compuestos debido a los múltiples picos con relaciones masa/carga tanto inferiores como superiores al pico molecular del ácido descobalto cobérico.

Por otro lado, según la bibliografía, JPM1 se especulaba ser descobalto cobalamina, siendo el patrón isotópico el siguiente:



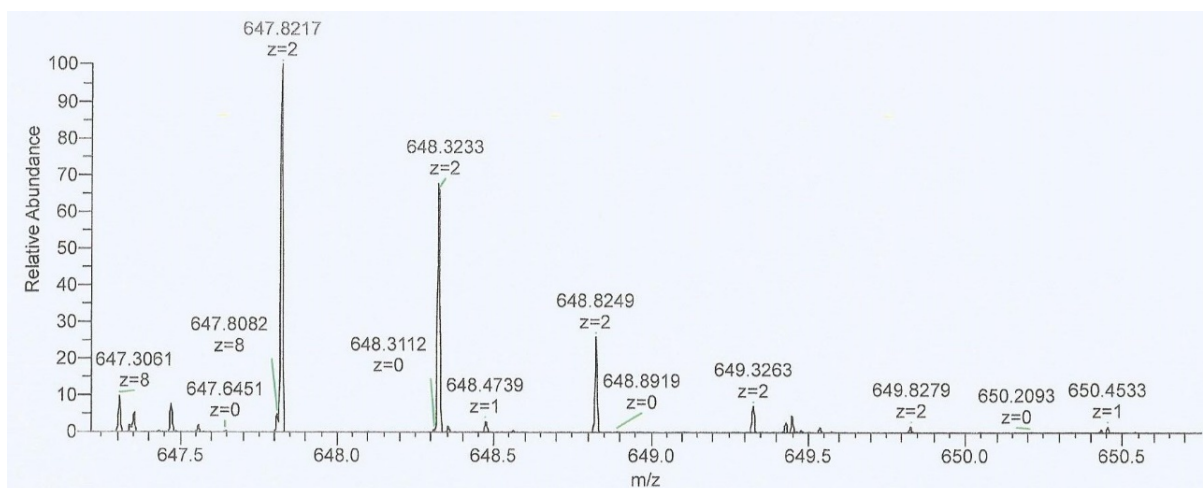
**Ilustración 8.** Patrón isotópico del descobalto cobalamina.

La fracción JPM1 presentó el siguiente espectro de masas:

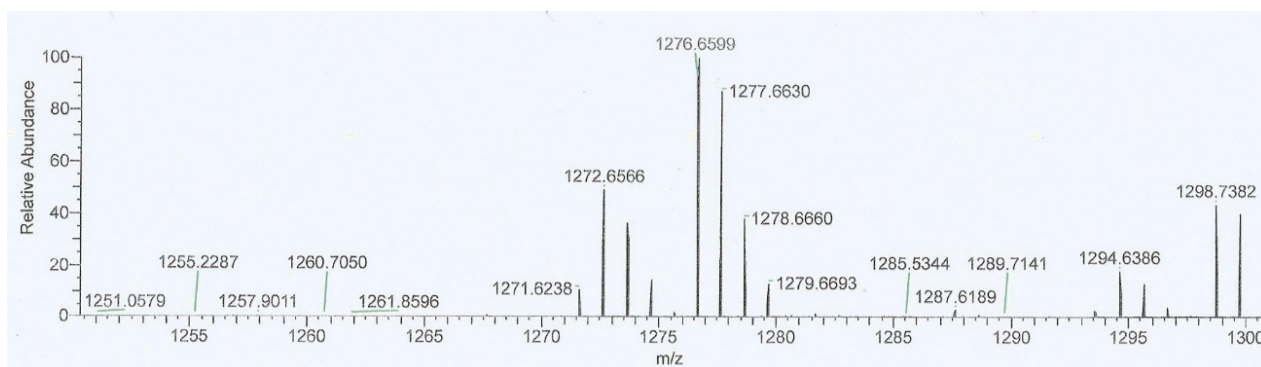


**Ilustración 9.** Espectro de masas de JPM1.

Pudiéndose éste (**Ilustración 9**) desglosar en dos más:



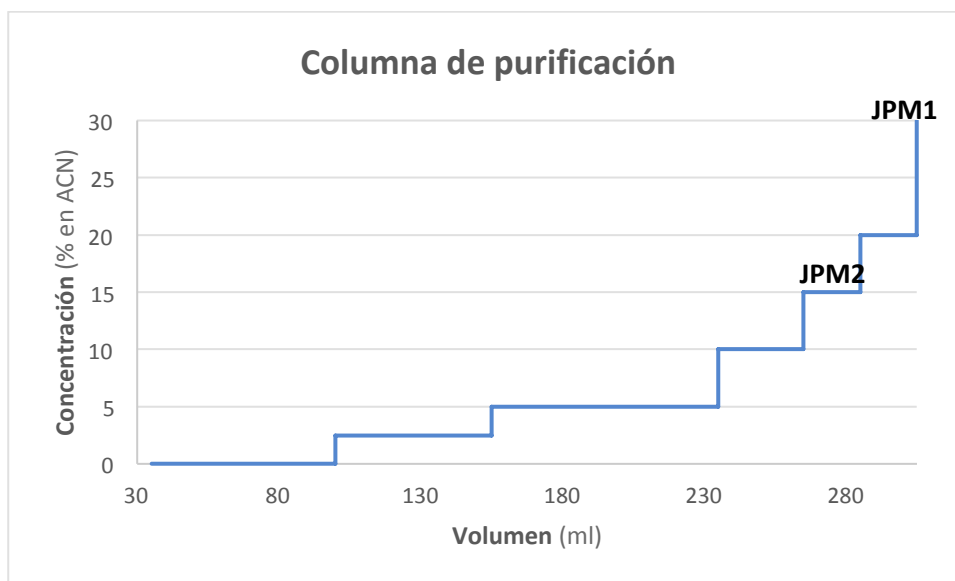
**Ilustración 10.** Ampliación del MS de JPM1, observándose unas relaciones m/Z que van desde 647,2 hasta 650,75.



**Ilustración 11.** Ampliación del MS de JPM1 en que se observan las relaciones masa/carga que van desde 1250 hasta 1300,5.

En la **Ilustración 11** se observa el patrón isotópico característico de la molécula de descobalto cobalamina, aunque este patrón está cargado de señales de relaciones masa/carga tanto superiores como inferiores, por lo que puede deducirse que la muestra no es pura, por lo tanto sucede exactamente lo mismo que en el caso anterior para JPM2.

Por todo ello posteriormente se realizaron 8 columnas de separación para conseguir la cantidad suficiente de JPM1 y JPM2 para poder realizar dos columnas de purificación, una para cada muestra, y así poder obtener los productos deseados.

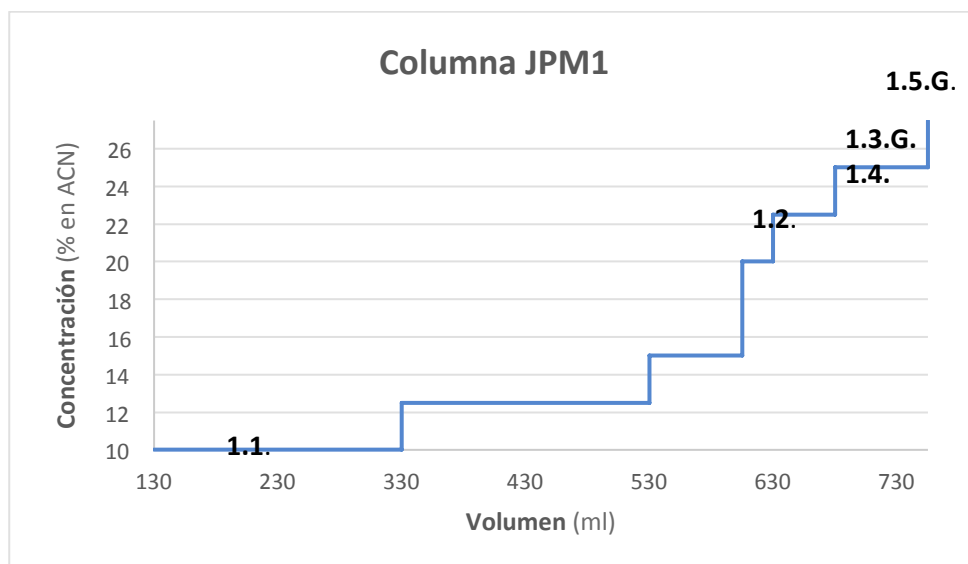


*Ilustración 12. Representación gráfica en escalones de los volúmenes en mililitros utilizados en el eje de abscisas frente a la concentración en porcentaje de ACN utilizado en el que se ha indicado los puntos en que se recogieron las diferentes fracciones.*

En la **Ilustración 12** se representa el volumen utilizado por cada concentración añadida, incluyéndose los puntos en que se recogieron las muestras. Este gráfico permite observar cómo disminuye la cantidad de eluyente necesario a medida que aumenta la concentración, hecho que remarca la importancia de las primeras fases de la purificación puesto que son claves para la correcta separación de las diferentes fracciones que componen la muestra.

### 6.2.1 Columna de JPM1

Como en la columna anterior JPM1 eluyó cuando el disolvente tenía una concentración del 30% en ACN se decidió realizar la columna de purificación de JPM1 trabajando en un gradiente de concentración que va desde ACN al 10% hasta ACN al 27,5%.

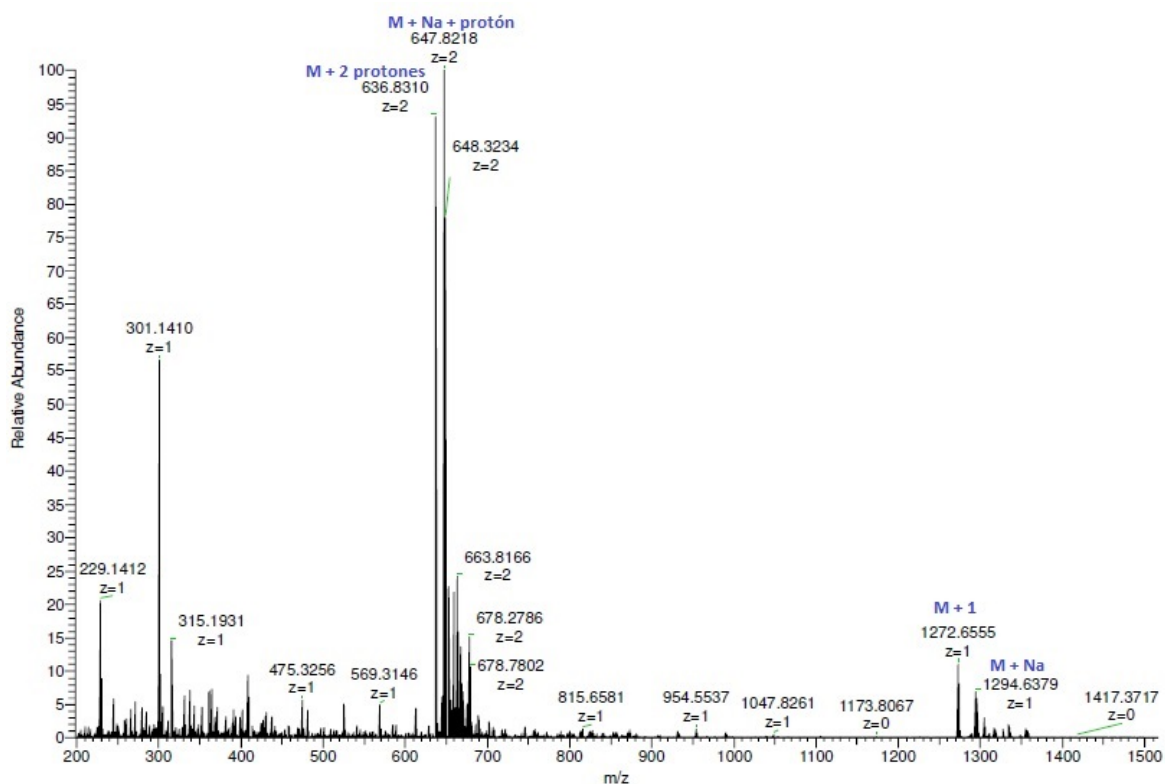


*Ilustración 13.* Representación gráfica de la purificación por columna en la que se presenta el volumen de eluyente en el eje de abscisas y la concentración en porcentaje de ACN en el eje de ordenadas donde se ha indicado los puntos en que se recogieron las diferentes fracciones de muestra.

En la **Ilustración 13** se representa el volumen de eluyente utilizado de cada concentración añadida en un gráfico escalonado en el que se incluye cuando se recogió cada muestra. Se observa la disminución gradual del aporte de eluyente así como aumenta la concentración durante la purificación de la muestra.

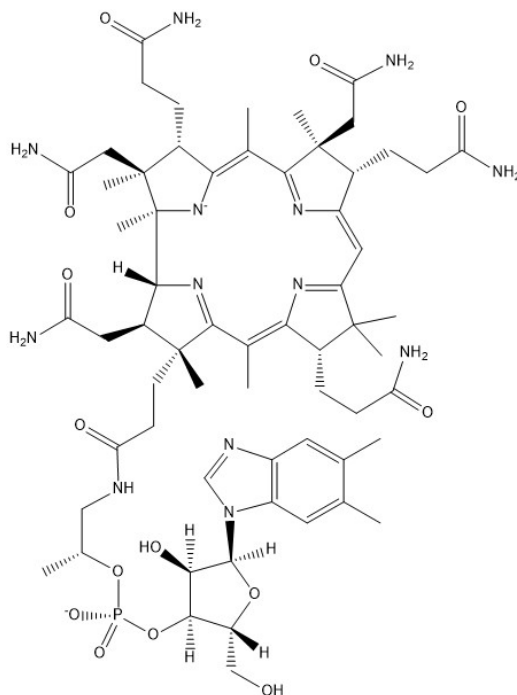
De las fracciones recogidas únicamente se analizaron mediante espectrometría de masas aquellas que presentaban coloración anaranjada o rosada, las fracciones con coloración amarilla se consideran productos de degradación, por lo que únicamente se analizaron las fracciones 1.1., 1.2. y 1.4.

De las fracciones obtenidas de JPM1, se concluye que la muestra 1.2. es descobalto cobalamina pura. En el espectro de masas de la muestra 1.2. (**Ilustración 14**) se determinan los siguientes picos:  $m/z$  1272,6555 ( $M+H^+$ ; calculada para  $C_{62}H_{91}N_{13}O_{14}P^+$ : 1272,6541, que se corresponde con el patrón isotópico de la **Ilustración 8**), 1294,6379 ( $M+Na^+$ ; calculada para  $C_{62}H_{90}N_{13}NaO_{14}P^+$ : 1294,6360), 636,8310 ( $M+2H^+$ ; calculada para  $C_{62}H_{92}N_{13}O_{14}P^{2+}$ : 636,8306) y 647,8218 ( $M+H^++Na^+$ ; calculada para  $C_{62}H_{91}N_{13}NaO_{14}P^{2+}$ : 647,82165).



**Ilustración 14.** Espectro de masas de la muestra 1.2. donde se han ilustrado los picos que caracterizan a la descobalto cobalamina.

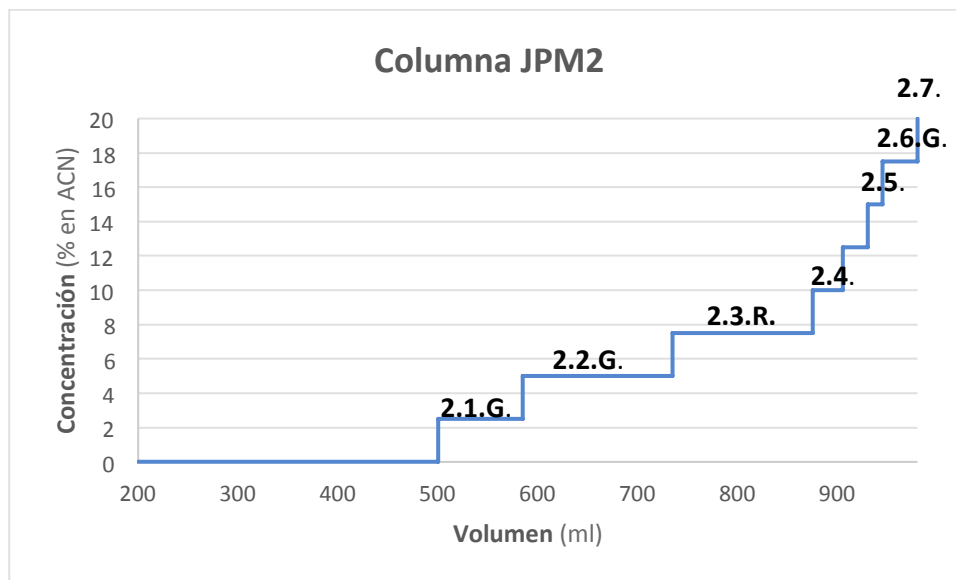
Entonces, la fracción 1.2. purificada de la fracción JPM1 recogida de *Allochrodatum vinosum* es descobalto cobalamina, del que se obtuvieron aproximadamente un total de 1,7 mg para su posterior uso en química de coordinación y cuya estructura es la que sigue:



**Ilustración 15.** Representación de la estructura de la descobalto cobalamina.

### 6.2.2 Columna de JPM2

En la purificación por columna, la fracción de JPM2 se recogió cuando el eluyente tenía una concentración del 15% en ACN, por lo que en la purificación de dicha fracción se decidió trabajar en gradiente partiendo del 0% (agua) hasta una concentración de ACN del 20%.



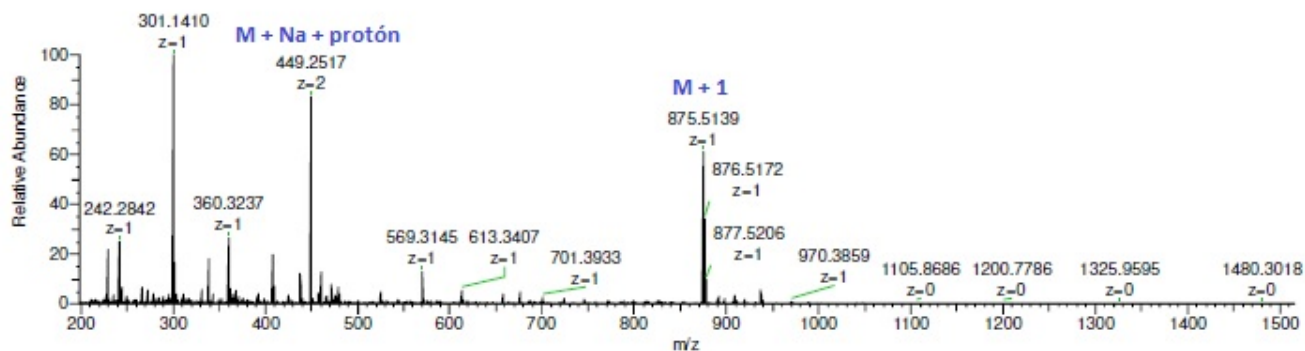
*Ilustración 16.* Representación gráfica escalonada del volumen en mililitros en el eje de abscisas y la concentración en porcentaje de ACN en el eje de ordenadas en que se ha indicado los puntos en que se recogieron las diferentes fracciones de muestra.

En la **Ilustración 16** se representa el volumen de eluyente utilizado frente a la concentración en porcentaje de ACN de dicho eluyente en un gráfico escalonado en el que se recogen los puntos en que eluyeron las diferentes fracciones de muestra. Se observa, al igual que en los dos apartados anteriores, la disminución gradual de la necesidad de eluyente para la correcta separación de la muestra.

Se consiguió purificar JPM2 obteniéndose 7 muestras distintas, las de coloración amarilla se consideran productos de degradación, por lo que únicamente se analizan las muestras que presentan una coloración rosada, analizándose mediante espectrometría de masas las muestras 2.3.R., 2.4. 2.5. y 2.7.

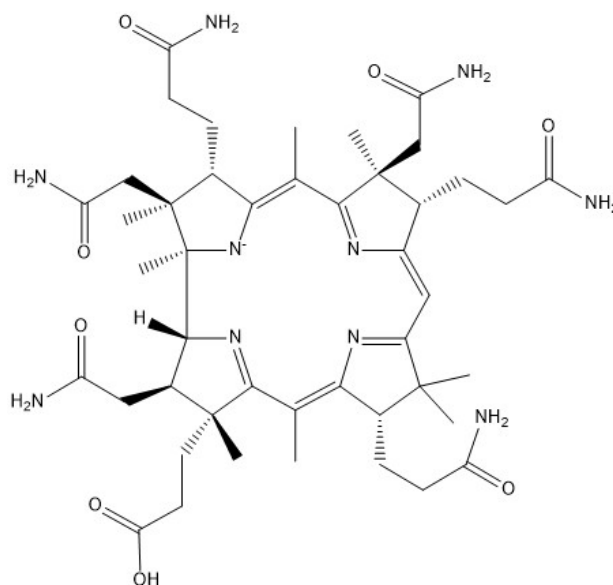
De las fracciones obtenidas de JPM2 se obtiene que la muestra 2.5. es ácido descobalto cobríco puro. En el espectro de masas de 2.5. (**Ilustración 17**) se determinan los siguientes picos: 875,5139 ( $M+H^+$ ; calculada para  $C_{45}H_{67}N_{10}O_8^+$ : 875,5138, que se corresponde con el patrón isotópico de la **Ilustración 7**) y 449,2517 ( $M+H^+Na^+$ ; calculada para  $C_{45}H_{67}N_{10}NaO_8^{2+}$ : 449,2515).





**Ilustración 17.** Espectro de masas de la muestra 2.5. donde se observan los picos con relaciones masa/carga que le caracterizan para poder concluir de que se trata de ácido descobalto cobérico.

Entonces, de la fracción JPM2, se obtiene que la muestra 2.5. es el ácido descobalto cobérico puro, del que a partir de 8 columnas se ha obtenido aproximadamente 1 mg para su posterior uso en química de coordinación y cuya estructura es la siguiente:



**Ilustración 18.** Representación de la estructura química del ácido descobalto cobérico.

## 7. Conclusión

Atendiendo a los resultados obtenidos, se puede concluir que se ha conseguido resolver la extracción y purificación del ácido descobalto cobríco así como de la descobalto cobalamina a partir de *Allochromatium vinosum*. Cabe destacar que según la bibliografía, las fracciones que se han denominado como JPM1 y JPM2 se suponían ser ya los productos puros aunque según los resultados obtenidos es evidente que constan de cinco y siete fracciones respectivamente aunque eso sí, derivando de cada muestra el producto esperado.

Se deduce que se han obtenido con elevada pureza debido a los espectros de masas analizados en el apartado anterior, por lo que estos productos resultarán idóneos para estudios de química de coordinación con metales en estado de oxidación +3. Especies de este estilo han revelado su posible uso como antibióticos y de ello deriva su interés.

No se ha podido llevar a cabo entonces el segundo apartado de objetivos de la memoria (química de coordinación con los productos obtenidos) por falta de tiempo y, por ende, tampoco se ha podido llevar a cabo el estudio de las posibles aplicaciones de dichos productos de coordinación; aunque tiene proyección en el futuro la síntesis y posterior estudio de aplicaciones.