



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Orgánica

## **Biocatálisis aplicada a la síntesis de productos de interés farmacológico e industrial. Síntesis química de derivados de quinolinas como agentes antiparasitarios**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Orgánica

**Santiago Nahuel Chanquia**

Directora de Tesis: **Dra. Guadalupe García Liñares**

Consejero de Estudios: **Dr. Javier Ramírez**

Lugar de trabajo: UMYMFOR – Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA

Lugar y fecha de defensa: Buenos Aires, 10 de diciembre de 2020

# **Biocatálisis aplicada a la síntesis de productos de interés farmacológico e industrial. Síntesis química de derivados de quinolinas como agentes antiparasitarios**

En el presente trabajo de tesis se investigaron estrategias enzimáticas y químicas de síntesis de compuestos diversos con potenciales propiedades farmacológicas. En primer lugar, se estudió la aplicación de lipasas para la obtención de derivados de vainillilamina, varios de ellos nuevos, de una forma eficiente y sustentable. Además, se evaluó la capacidad antiviral de los compuestos obtenidos contra distintas cepas de herpes, incluidas cepas resistentes al Aciclovir, obteniéndose resultados positivos.

También se obtuvieron derivados de ácido hiodesoxicólico (HDCA) de forma regioselectiva utilizando lipasas, obteniendo rendimientos excelentes y muy rápidamente. Adicionalmente, se utilizaron herramientas de modelado molecular para explicar en detalle las diferencias observadas en reactividad en los distintos grupos funcionales de la molécula de HDCA, así como también para entender en profundidad cómo interactúa este sustrato con el sitio catalítico de una de las lipasas más utilizadas en síntesis, como *Candida antarctica B*.

Además, se desarrolló un proceso novedoso de síntesis de alcoholes utilizando una enzima alcohol deshidrogenasa y un solvente eutéctico profundo como “co-sustrato inteligente”, obteniéndose resultados excelentes para la obtención de ciclohexanol y logrando extrapolar esta estrategia para la obtención de otros alcoholes.

Por último, mediante síntesis química se obtuvieron numerosos derivados de quinolina, algunos de los cuales mostraron tener una buena actividad antiparasitaria frente a *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi*. Además, se postuló un posible mecanismo de acción de los mismos.

---

**Palabras clave:** lipasas, alcohol deshidrogenasas, capsaicinoides, antivirales, esteroides, ácidos borónicos, antiparasitarios, solventes eutécticos profundos

---

# Application of biocatalysis to the synthesis of products of pharmacological and industrial interest. Chemical synthesis of quinoline derivatives as antiparasitic agents

Several enzymatic and chemical strategies for the synthesis of different compounds with potential pharmacological properties were investigated in this thesis. The application of lipases for the development of an efficient and sustainable synthesis strategy of vanillylamine derivatives, most of them new, was studied. Besides, all the obtained products were evaluated as antivirals against different types of herpes, including Acyclovir-resistant strains, obtaining positive results.

Also, hyodeoxycholic acid (HDCA) derivatives were obtained in a regioselective way using lipases, with excellent yields and short reaction times. Additionally, molecular modeling tools were used to explain the observed differences in the reactivity of the different moieties of the HDCA molecule, and also to better understand how this substrate interacts with the catalytic site of one of the most used lipases in synthesis, as is *Candida antarctica B*.

In addition, a novel process for the synthesis of alcohols was developed, using an alcohol dehydrogenase and a deep eutectic solvent as an “smart cosubstrate”, obtaining excellent results for the synthesis of cyclohexanol and successfully extrapolating this strategy to other alcohols.

Lastly, a strategy of chemical synthesis was applied as well for the synthesis of quinoline derivatives, some of which proved to be effective antiparasitic agents against *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi*.

---

**Keywords:** lipases, alcohol dehydrogenases, capsaicinoids, antivirals, steroids, boronic acids, antiparasitics, deep eutectic solvents

---

# Abreviaturas

**1,4-BD:** 1,4-butanodiol

**A/S:** Relación agente acilante/sustrato

**ACV:** Aciclovir

**ADH:** Alcohol deshidrogenasa

**BCA:** Ácido bicinconínico

**Bnz:** Benznidazol

**CA:** Ácido cólico

**CAL-B:** Candida antarctica lipase B

**CC<sub>50</sub>:** Concentración citotóxica 50

**CCC:** Cardiomiopatía crónica provocada por Enfermedad de Chagas

**FDH:** Formiato deshidrogenasa

**FID:** Detector de ionización de llama

**FXR:** Receptor farnesoide X

**GBL:**  $\gamma$ -butirolactona

**GC/CG:** Cromatografía gaseosa

**GDH:** Glucosa deshidrogenasa

**HBA:** Aceptor de unión de hidrógeno

**HBD:** Donor de unión de hidrógeno

**HDCA:** Ácido hiodesoxicólico

**HLADH:** Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo

**HPLC/CLAR:** Cromatografía líquida de alta resolución

**HRMS/EMAR:** Espectrometría de masas de alta resolución

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria 50

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosido

**IR:** Espectroscopía infrarroja

**IUBMB:** Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

**CCD:** Cromatografía de capa delgada

**CDCA:** Ácido quenodesoxicólico

**CFE:** Extracto libre de células

**ChCl:** Cloruro de colina

**CHL:** Ciclohexanol

**CHO:** Ciclohexanona

**CLEA:** Cross-Linked Enzyme Aggregates

**CLEC:** Cross-Linked Enzyme Crystals

**CONICET:** Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**CPL:** Carica papaya

**LB:** Caldo de lisogenia

**LCA:** Ácido litocólico

**LI:** Líquido iónico

**MPV:** Reducción de Meerwein-Ponndorf-Verley

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**NAD\*:** Dinucleótido de nicotinamida y adenina

**NADES:** Solventes eutécticos profundos naturales

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**Ni-NTA:** Níquel-ácido nitrilotriacético

**Nu/S:** Relación nucleófilo/sustrato

**NVA:** *N*-acilvainillilamina

**OMS:** Organización mundial de la salud

**PBS:** Buffer fosfato

**PDB:** Protein Data Bank

**pH:** Potencial de hidrógeno

**Py:** Piridina

**CRL:** Candida rugosa lipase

**DCA:** Ácido desoxicólico

**DCF:** diclorofluoresceína

**DES:** Solventes eutécticos profundos

**DIPE:** Diisopropil éter

**DMAP:** 4-dimetilaminopiridina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DTNB:** 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato

**E/S:** Relación enzima/sustrato

**EC:** Comisión de enzimas

**EC<sub>50</sub>:** Concentración efectiva 50

**RMIM:** Rhizomucor miehei 1M

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**ROL:** Rhizopus oryzae

**ROS:** Radicales libres de oxígeno

**RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute

**SHU:** Unidades Scoville

**SI:** Índice de selectividad

**TB:** Caldo terrific

**TEA:** Trietilamina

**Tris-HCl:** Trisaminometano-ácido clorhídrico

**TRP:** Receptor de potencial transitorio

**U:** Unidades enzimáticas

**UMYMFOR:** Unidad de Microanálisis y Metodos Fisicos en Quimica Orgánica

**UV-Vis:** Ultravioleta-visible

**VA:** Vainillilamina

**VHS-1:** Herpes simple tipo 1

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

## Agradecimientos

A lo largo de los años de trabajo que fueron necesarios para la realización de esta tesis, numerosas personas e instituciones influyeron en el producto final, muchas de ellas siendo incluso indispensables. La siguiente enumeración, seguramente incompleta e injusta debido a la impericia del autor, así como al espacio limitado, busca reconocer al menos algunas de ellas.

En primer lugar, quiero agradecer a Guadalupe García Liñares, mi directora de tesis durante casi todo este camino por su confianza en mis ideas, así como también por su apoyo y guía. Me siento afortunado de haber trabajado junto a una persona con una calidad humana y profesional como la de ella.

También a Javier Ramirez, mi Consejero de Estudios, a Lucía Kordich, y a Alicia Baldessari, quien me dio la oportunidad de comenzar a investigar en nuestro laboratorio.

A Selin Kara, Lei Huang y al Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, que me recibieron con los brazos abiertos y de quienes aprendí muchísimo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Fabricio Freije García, Antonela Zígolo, Paula Quintana, Agustina Pavicich, Lucía Da Cruz Cabral, Paula Zema, Markus Hobisch, Jennifer Engel, Kim Møller Johansen, Alex Cordellier, Paula Colombato, Erika Ripani y Facundo Larregui.

También quiero mencionar a mis afectos y amigos, algunos de ellos desperdigados por el mundo, pero a un llamado de distancia. Principalmente a Guido Cultraro, Esteban Cultraro, Paola Pastorini Gayol, Juan Manuel Rodríguez Samia, Mariano Temperley, Iván Bograd, Sebastián Coda, Agustín Renzi, Mercedes Ubeira, Agustín Curia, Mariano Valot, Franco Huvierne, Mariana Ormaechea, Oana Toda, Giulio Carraturo y flia., Rocío Muñiz, Mathilde Hernu, Constanza Terazzi, Alejandro Camera, Ayelén Beigbeder, Leoncia Villalba y flia., Alicia Lachari, Roberto Molbert, Natalia Molbert y flia., Mercedes Delprato, Pedro Chanquia, Graciela Cortina, Carlos Chanquia y flia., Eric Bouvron y flia., Theo Bouvron y Mercedes Chanquia.

Agradezco a Doña Ana del poblado de El Oro, Bolivia, por salvarme la vida aquella vez, aunque nunca lo sabrá.

No quiero dejar de agradecer muy especialmente a mis padres, Martín y Andrea, y a mi hermano Tomás. Tres imprescindibles que siempre han estado de mi lado.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a las autoridades, integrantes y personal de CONICET, UMYMFOR, y del Departamento de Química Orgánica, cuyo aporte para la realización de esta tesis fue fundamental en todos los aspectos.

*A la educación pública*

# Contenido

<b>Introducción</b> .....	1
1.1. Catálisis .....	2
1.2. Biocatálisis y biotransformaciones.....	3
1.3. Historia de la biocatálisis.....	4
1.4. Clasificación de los catalizadores.....	5
1.5. Medio de reacción. Biocatálisis en medios no acuosos.....	5
1.6. Solventes eutécticos profundos en biocatálisis .....	8
1.7. Selectividad .....	9
1.8. Promiscuidad.....	9
1.9. Aumento de la velocidad .....	10
1.10. Clasificación y nomenclatura de las enzimas .....	11
1.11. Enzimas aisladas.....	12
1.12. Hidrolasas .....	12
1.13. Lipasas.....	13
1.14. Mecanismo catalítico .....	17
1.15. Oxidorreductasas.....	17
1.16. Alcohol deshidrogenasas .....	18
1.17. Mecanismo catalítico .....	20
1.18. Origen natural de las lipasas y las alcohol deshidrogenasas.....	21
1.19. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas y las alcohol deshidrogenasas .....	22
1.20. Modelado molecular .....	22
1.21. Síntesis química de antiparasitarios utilizando ácidos fenilborónicos .....	24
1.22. Conclusiones .....	25
<i>Bibliografía</i> .....	26
<b>Objetivos</b> .....	36
<i>Bibliografía</i> .....	39

<b><i>Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir</i></b> .....	40
3.1. Introducción.....	41
3.2. Resultados y discusión.....	44
3.3. Selección de la enzima y efecto del solvente .....	45
3.4. Efecto de la relación enzima:sustrato.....	48
3.5. Efecto de la relación agente acilante:sustrato .....	48
3.6. Influencia de la temperatura .....	50
3.7. Síntesis de derivados de vainillilamina .....	50
3.8. Modelado molecular .....	52
3.9. Evaluación biológica.....	55
3.10. Conclusiones .....	58
<i>Bibliografía</i> .....	60

<b><i>Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico</i></b> .....	63
4.1. Introducción.....	64
4.2. Resultados y discusión.....	66
4.3. Esterificación enzimática.....	66
4.4. Acetilación enzimática .....	71
4.5. Alcohólisis enzimática .....	72
4.6. Modelado molecular .....	73
4.7. Conclusiones .....	75
<i>Bibliografía</i> .....	76

<b><i>Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH</i></b> .....	79
5.1. Introducción.....	80
5.2. Resultados y discusión.....	83



5.4. Optimización de condiciones de reacción.....	85
5.5. Reducción de otros sustratos .....	89
5.6. Escalado del proceso e inmovilización de HLADH .....	90
5.7. Conclusiones .....	93
<i>Bibliografía</i> .....	94

## **Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria..... 97**

6.1. Introducción.....	98
6.2. Resultados y discusión.....	105
6.3. Síntesis de arilaminoquinolinas .....	105
6.4. Evaluación biológica.....	107
6.5. Actividad anti <i>Leishmania mexicana</i> .....	108
6.6. Actividad anti <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	109
6.7. Citotoxicidad.....	110
6.8. Interacción con la hemina.....	112
6.9. Estado redox intracelular.....	113
6.10. Conclusiones .....	114
<i>Bibliografía</i> .....	116

## **Parte experimental..... 122**

7.1. Generalidades.....	123
7.1.1. Reactivos y solventes.....	123
7.1.2. Biocatalizadores .....	123
7.1.2.1. Lipasas comerciales .....	123
7.1.2.2. Lipasas provenientes de agro-residuos .....	124
7.1.2.3. Oxidorreductasas.....	125
7.1.3. Separaciones .....	125
7.1.4. Cálculos computacionales.....	126
7.1.5. Reactores .....	126
7.1.6. Caracterización estructural.....	126
7.2. Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir .....	129
7.2.1. Procedimiento general para la síntesis de <i>N</i> -acilvainillilaminas .....	129

7.2.2.	Ensayos biológicos .....	133
7.2.2.1.	Células, virus y reactivos .....	133
7.2.2.2.	Ensayos de citotoxicidad .....	133
7.2.2.3.	Actividad antiviral .....	133
7.3.	Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico .....	134
7.3.1.	Procedimiento general para la síntesis catalizada por lipasas de ésteres del ácido hiodesoxicólico .....	134
7.3.2.	Procedimiento general para la acetilación catalizada por lipasas .....	134
7.3.3.	Alcoholisis catalizada por lipasas .....	135
7.3.4.	Peracetilación química .....	135
7.4.	Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH .....	140
7.4.1.	Producción de HLADH .....	140
7.4.2.	Cinética enzimática .....	140
7.4.3.	Preparación de solventes eutécticos profundos.....	141
7.4.4.	Reducción de cetonas.....	141
7.4.5.	Inmovilización de HLADH .....	141
7.4.6.	Análisis por cromatografía gaseosa .....	141
7.5.	Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria .....	142
7.5.1.	Procedimiento general para la síntesis de derivados de quinolina ....	142
7.5.2.	Parásitos .....	149
7.5.3.	Ensayos <i>in vitro</i> para determinar actividad anti-leishmania .....	150
7.5.4.	Ensayos <i>in vitro</i> para determinar actividad anti-trypanosoma .....	150
7.5.6.	Unión a hemina .....	152
7.5.7.	Actividad redox sobre tioles .....	152
7.5.8.	Actividad oxidativa intracelular .....	153
7.5.9.	Análisis estadístico .....	153
	<i>Bibliografía</i> .....	154
	<b>Conclusiones finales</b> .....	155

# **CAPÍTULO 1**

## ***Introducción***

*Había una vez un becario...*

# 1. Introducción

## 1.1. Catálisis

La catálisis es un fenómeno conocido desde la antigüedad, que probablemente se utilizó primero para uno de los fines más elevados posibles: la obtención de alcohol por fermentación. Ya en el año 2000 a.C., por ejemplo, civilizaciones que habitaban en el valle del Indo, al noroeste de la actual India, conocían cómo obtener Sura, una bebida alcohólica destilada a partir de arroz fermentado, cebada, azúcar de palma y flores nativas.<sup>1</sup> A pesar de esto, fue varios milenios después que comenzó a comprenderse acabadamente el fenómeno.

En 1552, el alemán Valerius Cordus utilizó ácido sulfúrico para catalizar la conversión de alcohol a éter etílico, en lo que fue el primer uso conocido de catalizadores inorgánicos.<sup>2</sup> Pero recién en 1794, la química escocesa Elizabeth Fulhame sentó las bases del concepto de catálisis en un libro<sup>3</sup> en el que detallaba sus experimentos con reacciones de óxido-reducción. Cuatro décadas más tarde, el químico sueco Jöns Jacob von Berzelius propone la palabra catálisis, del griego καταλυσις (aflojar, romper), para describir reacciones químicas en las cuales la velocidad aumenta, a veces enormemente, debido a la presencia de una sustancia (catalizador) que no se altera con el curso de la reacción<sup>4</sup>. Esto último, que es una característica fundamental de los catalizadores, permite que puedan recuperarse y volver a utilizarse de forma eficiente.

Los catalizadores son compuestos de una enorme importancia práctica, ya que utilizando una cantidad mínima pueden aumentar la velocidad de una reacción en varios órdenes de magnitud, lo que posibilita llevar a cabo procesos que, en muchos casos, serían irrealizables. Además, este marcado aumento de la velocidad permite emplear condiciones de reacción más suaves (temperatura, presión, etc.) que aquellas que deberían aplicarse en ausencia del catalizador. Por otro lado, en numerosas ocasiones el uso de catalizadores hace posible obtener selectivamente un cierto producto, lo cual aumenta de forma significativa el rendimiento de los procesos.

Las aplicaciones de los catalizadores a lo largo de la historia de la humanidad han sido muchas y variadas, desde la fabricación de quesos y vinos hasta la obtención de polímeros estereorregulares a escala industrial utilizando catalizadores de Ziegler-Natta<sup>5</sup>. Y hoy más que nunca, el número sigue creciendo, dándole a la catálisis un rol central no sólo en las ciencias químicas en particular, sino en el desarrollo humano todo.

## 1.2. Biocatálisis y biotransformaciones

En los organismos vivos todo el tiempo ocurre un gran número y variedad de procesos complejos que involucran reacciones químicas; muchos de estos procesos no podrían ocurrir a una velocidad adecuada sin la participación de un tipo muy especial de catalizadores: las enzimas.

Las enzimas, denominadas de esa manera por el fisiólogo Wilhelm Kühne en 1878,<sup>6</sup> son catalizadores biológicos que, como cualquier otro catalizador, actúan reduciendo la energía de activación de un dado proceso. Generalmente, el sitio activo de una dada enzima es una parte pequeña de ésta, y está compuesto de un sitio de unión y un sitio catalítico. La unión del sustrato ocurre en el sitio de unión y es en el sitio catalítico donde ocurre el proceso de catálisis. Al tener una estructura flexible, las enzimas se pliegan para estabilizar al sustrato mediante interacciones electrostáticas.<sup>7, 8</sup> La gran mayoría de las enzimas son proteínas, aunque también se conocen moléculas de ácido ribonucleico que poseen actividad catalítica, denominadas ribozimas.<sup>9, 10</sup>

El término *biocatálisis* se refiere al uso de organismos vivos o enzimas aisladas para catalizar un dado proceso químico; en particular, cuando un sustrato es modificado por un organismo vivo, a este proceso se lo denomina *biotransformación*.

Al comparar la biocatálisis con la catálisis química convencional la mayor ventaja que debe mencionarse es su excelente selectividad. Por otro lado, el hecho de que las enzimas sean activas en condiciones suaves de reacción es algo muy valorado en procesos industriales. Especialmente en la actualidad cuando se busca cada vez más que dichos procesos sean sostenibles y amigables con el medio ambiente. Debido a la diversidad estructural de las enzimas, éstas tienen el potencial para catalizar procesos muy diferentes. No sólo eso, sino que además es posible llevar adelante una reacción biocatalizada controlada utilizando sustratos distintos a los que la enzima utilizaría en el proceso metabólico del cual proviene. Ésto, sumado a la posibilidad de editar la secuencia de aminoácidos de la enzima mediante ingeniería genética o a la combinación de un biocatalizador con catalizadores químicos le confiere a la biocatálisis un potencial que aún se encuentra lejos de alcanzar su techo.<sup>11, 12</sup>

Aunque claro, nada es perfecto, y también podemos mencionar tres desafíos notorios con los cuales se enfrenta la biocatálisis: muchas veces los biocatalizadores no son suficientemente estables en el medio de reacción utilizado y/o en altas concentraciones de sustrato; muchos biocatalizadores no se encuentran bien caracterizados o no están disponibles comercialmente; y, además el ciclo de desarrollo de nuevos procesos biocatalíticos es muy largo.

### 1.3. Historia de la biocatálisis

Hace más de diez mil años, en distintos lugares del mundo se produjo de forma independiente un cambio revolucionario en la producción de alimentos: la introducción de la agricultura y la ganadería.<sup>13</sup> La disponibilidad de comida abundante y segura permitió que se establezcan las primeras comunidades sedentarias, lo que llevó a un marcado aumento de la población. Este importante avance generó con el correr del tiempo la necesidad de desarrollar técnicas de conservación para poder consumir los comestibles excedentes en otro momento, y es así que comenzaron a utilizarse hongos, levaduras y enzimas digestivas para llevar adelante procesos fermentativos sobre distintos alimentos obteniéndose productos tales como vino, cerveza, pan o queso y, si bien en un principio estos procesos ocurrieron accidentalmente, al ver su gran utilidad pronto comenzaron a ser utilizados de forma controlada por el hombre.<sup>14-16</sup>

Esta aplicación de los biocatalizadores, no sólo ocupó un lugar preponderante en la producción de alimentos, sino también en la cultura y religión de numerosos pueblos. Basta mencionar a Dionisio, dios griego del vino luego llamado Baco en Roma, al dios báltico Ragutis, que insuflaba vida al grano transformándolo en pan y cerveza, o el fuerte simbolismo que tiene el pan en las religiones abrahámicas.

Si bien los productos de fermentación se produjeron en casi todas las regiones del globo durante milenios, recién en el siglo XIX se comenzó a estudiar en detalle el fenómeno de la fermentación, con el objetivo de mejorar la eficiencia en la producción de alimentos. Fue así, que entre 1837 y 1838 Cagniard de la Tour, Schwann y Kützing concluyeron de forma independiente que las levaduras son organismos vivos.<sup>17-19</sup> Algunos años después, tras los trabajos revolucionarios de Cohn, Koch, Beijerinck, Winogradsky y Pasteur, se comenzó a estudiar de manera sistemática a los microorganismos, dando origen a la disciplina de la *Microbiología*. Estos avances permitieron, entre otras cosas, realizar fermentaciones de forma mucho más eficiente.

De forma paralela, comenzó a desarrollarse el área de la *Bioquímica*. En el año 1833, los franceses Payen y Persoz aislaron por primera vez a partir de un extracto de malta, una sustancia que cataliza la hidrólisis del almidón, a la que bautizaron diastasa, del griego *διασπασις* (separación).<sup>20</sup>

Durante el siglo XIX ambos campos contribuyeron al desarrollo y optimización de la biocatálisis. Se mejoraron los procesos de producción de bebidas alcohólicas al haberse identificado los organismos responsables de la fermentación alcohólica y láctica y comenzó a obtenerse etanol y metanol eficientemente de forma industrial utilizando biocatalizadores. Utilizando microorganismos, se hizo posible la síntesis de productos químicos quirales sumamente importantes, como el ácido L-ascórbico. Además, el empleo de enzimas aisladas proveyó alternativas económicamente viables para la fabricación de productos químicos.

En el siglo XX la bioquímica creció de forma exponencial generando enormes adelantos en el campo de la biocatálisis. En 1926, Sumner logró por primera vez cristalizar una enzima (ureasa), determinando de forma inequívoca que ésta es una proteína, trabajo que le valió el premio Nobel de Química en 1946.<sup>21</sup>

Las contribuciones de Pauling<sup>22</sup> y el desarrollo y aplicación de la espectroscopía de difracción de rayos X, permitieron determinar la estructura secundaria y terciaria de las enzimas y para la década de 1950 cientos de enzimas fueron aisladas y caracterizadas.

La aparición de la ingeniería genética en la década de 1980 revolucionó los horizontes de la biocatálisis ya que permitió modificar las enzimas, y así tener un gran control sobre sus propiedades catalíticas. Este avance crucial permitió el salto de la biocatálisis para su aplicación en la manufactura de productos químicos a gran escala.

Hoy en día, la biocatálisis se presenta no sólo como un complemento a la catálisis tradicional, sino como una alternativa cada vez más importante para poder resolver desafíos modernos tanto en el ámbito industrial como científico.

#### **1.4. Clasificación de los catalizadores**

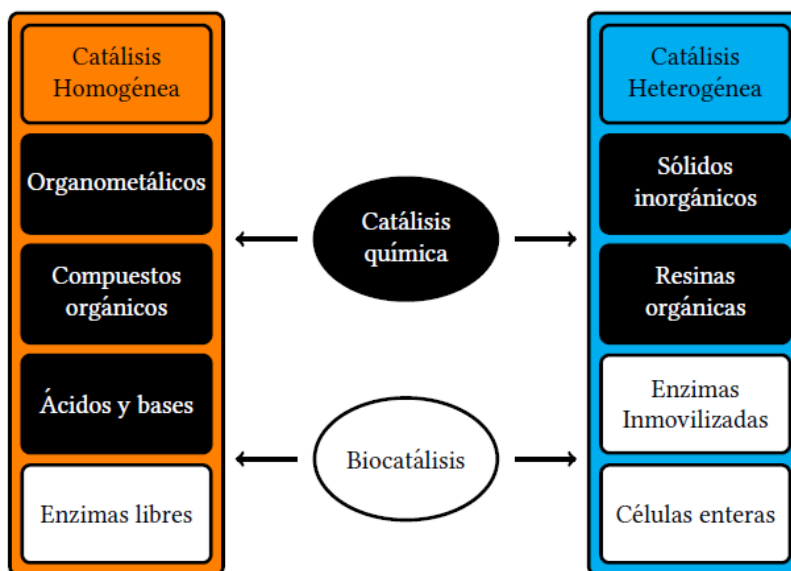
Como puede apreciarse en la figura 1.1, la catálisis puede clasificarse de dos maneras. De acuerdo al origen de los catalizadores, es decir, si éstos son biocatalizadores o catalizadores químicos, o según el estado físico de los mismos en el medio de reacción, de forma homogénea o heterogénea. En la catálisis homogénea, el catalizador se encuentra en la misma fase que los reactivos. En la heterogénea, éstos se encuentran en distintas fases.<sup>23</sup>

#### **1.5. Medio de reacción. Biocatálisis en medios no acuosos**

Si bien los biocatalizadores en los organismos vivos trabajan en medio acuoso y en condiciones acotadas, tanto de pH como de temperatura y fuerza iónica, se ha observado que en otros medios también pueden catalizar reacciones,<sup>24, 25</sup> lo cual permitió que la disciplina de la biocatálisis ampliara enormemente su aplicación.

En 1936, el bioquímico polaco Ernest Sym probó la acción de esterasas en solventes orgánicos, obteniendo excelentes rendimientos para la síntesis de ésteres sencillos,<sup>26</sup> que es exactamente lo opuesto a lo que estas enzimas llevan a cabo en un medio acuoso.

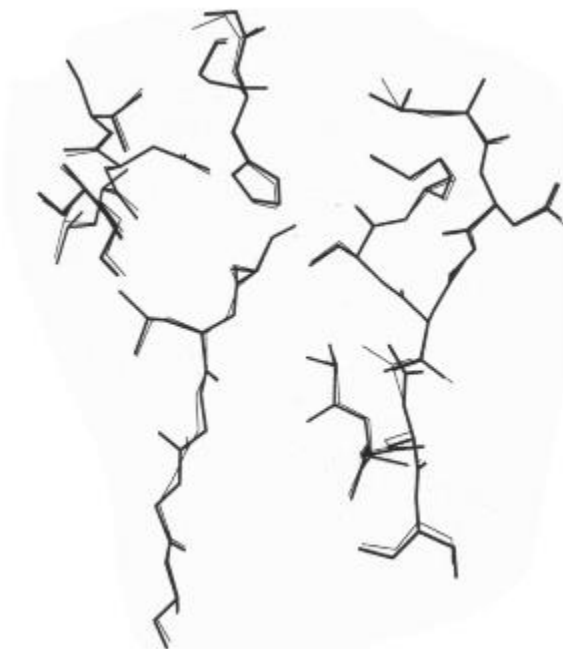
Casi cincuenta años después, a principios de la década del 80', Klibanov y colaboradores analizaron la estabilidad y selectividad de enzimas aisladas en reacciones biocatalizadas sobre una variedad de sustratos en distintas condiciones.<sup>27, 28</sup> Es de particular interés el estudio del efecto de los solventes orgánicos sobre la estabilidad y selectividad de los biocatalizadores, lo que amplió el campo de aplicación de las enzimas a sustratos insolubles en medios acuosos y significativamente distintos a sus sustratos biológicos<sup>29</sup>.



**Figura 1.1.** Clasificación de los catalizadores.

En un trabajo posterior,<sup>30</sup> nuevamente el grupo de Klibanov postuló que en medios no acuosos las enzimas se tornan más rígidas, por lo que serían aún más estables que en medio acuoso, donde son conformacionalmente lábiles y susceptibles a cambios de temperatura o a la presencia de agentes caotrópicos y, como puede verse en la figura 1.2, el sitio activo se conserva de forma prácticamente idéntica. Un notable descubrimiento fue que las enzimas en medio orgánico retienen una cantidad mínima de agua ligada, denominada agua estructural, prácticamente en la misma posición que en medio acuoso, por lo que debe ser considerada como una parte integral de la estructura de la proteína. Esta agua es responsable de que las enzimas conserven su estabilidad y capacidad catalítica en medios no acuosos. Numerosos estudios utilizando cristalografía de rayos X y otros más recientes utilizando dinámica molecular, han confirmado satisfactoriamente las hipótesis de Klibanov.<sup>31-34</sup>





**Figura 1.2.** Detalle del sitio activo de la subtilisina Carlsberg en acetoneitrilo (líneas oscuras), superpuesto con el mismo en agua (líneas claras). Modificada de Fitzpatrick et al.

Las enzimas en medio orgánico pueden utilizarse de diversas maneras: dispersas en la fase orgánica, utilizando un detergente para formar una emulsión, o bien en fase sólida, liofilizadas o inmovilizadas en un soporte inerte, mostrando frecuentemente en este último caso, actividad y estabilidad superiores a las enzimas libres.<sup>35</sup> Además, en este caso es posible separar las enzimas inmovilizadas del medio de reacción simplemente por filtración, lo que facilita su recuperación en una operación *batch*. Actualmente, la inmovilización constituye un importante objeto de estudio ya que es considerada fundamental para optimizar el desempeño de los biocatalizadores en medios no acuosos, utilizándose una gran variedad de soportes.<sup>36</sup>

Las células enteras también pueden emplearse en solventes orgánicos, aunque su estabilidad es menor que la de las enzimas aisladas. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos de inmovilización de células con el objetivo de mejorar su estabilidad.<sup>37-39</sup>

De la mano del crecimiento mostrado por la disciplina conocida como Química Verde, la atención ha virado hacia la utilización de otros medios de reacción con un menor impacto ambiental, tal como los fluidos supercríticos<sup>40</sup> o ciertos líquidos iónicos (LI).<sup>41</sup> Entre los últimos, destacan los solventes eutécticos profundos (comúnmente denominados DES, por su sigla en inglés), un nuevo tipo de líquidos iónicos muy adecuados para la biocatálisis, tanto en pequeña como en gran escala, con los cuales se han obtenido resultados destacables.<sup>42-44</sup>

## 1.6. Solventes eutécticos profundos en biocatálisis

Los DES se describieron por primera vez en el año 2003,<sup>45</sup> y recién en 2008 se publicaron las primeras reacciones enzimáticas en este tipo de solventes,<sup>46</sup> por lo que al ser un área de trabajo tan reciente son numerosos los desafíos que pueden abordarse para investigar en el laboratorio.

Los DES son solventes eutécticos que suelen prepararse de forma muy sencilla, mezclando un donador de unión de hidrógeno y un aceptor de unión de hidrógeno (HBD y HBA respectivamente, por sus siglas en inglés) bajo agitación y calor hasta que se forma un líquido, que permanece en ese estado debido a la formación de uniones de hidrógeno intermoleculares que bajan notablemente el punto de fusión,<sup>47</sup> como se aprecia en la figura 1.3. Cuando los componentes del DES provienen de fuentes naturales se denominan solventes eutécticos profundos naturales (NADES, por sus siglas en inglés).



**Figura 1.3.** Componentes de un DES. Modificada de Pätzold et al.<sup>48</sup>

Cada vez más estudios colocan a los DES como alternativas ambientalmente aceptables o incluso mejores que otros solventes más comunes para biotransformaciones, ya que pueden diseñarse de forma que sean no tóxicos, no volátiles, no inflamables e incluso biodegradables. Es por estas razones que suele describirse los como solventes “verdes”.<sup>49</sup>

A todo esto se suma la posibilidad de ajustar de forma muy precisa las propiedades físicas del solvente cambiando las proporciones y la naturaleza de los componentes usados para formarlo, además de la cantidad de agua o buffer que se le agrega, por lo que muchas veces es posible desarrollar un DES a la medida del proceso que se desea realizar.

Actualmente se aplican numerosas enzimas e incluso células enteras para llevar adelante diversos procesos biocatalíticos en DES, incluyendo esterificaciones, transesterificaciones, reacciones aldólicas, formación de enlaces peptídicos, entre otras.<sup>48</sup>

### 1.7. Selectividad

Uno de los grandes desafíos de la Química Orgánica es llevar adelante reacciones de forma selectiva, y es aquí donde la utilización de biocatalizadores aporta excelentes soluciones, siendo que las estrategias de síntesis de moléculas complejas suelen involucrar numerosos pasos, incluyendo la utilización de grupos protectores, resoluciones de mezclas racémicas, y/o purificación de productos secundarios no deseados. En este contexto, el uso de biocatalizadores permite, en muchos casos, discriminar entre distintos grupos reactivos de una molécula, o reaccionar selectivamente con uno de los componentes de una dada mezcla. Esto puede resultar en un camino sintético con un menor número de pasos de reacción y una mayor eficiencia global en comparación con una estrategia sintética que no utilice biocatalizadores.

La selectividad de una dada reacción puede denominarse *quimioselectividad*, cuando discrimina entre grupos funcionales, *regioselectividad*, cuando lo hace entre grupos funcionales idénticos en distintos sitios de una dada molécula, o *estereoselectividad*, cuando lo hace entre distintos estereoisómeros, incluso enantiómeros. Frecuentemente, los biocatalizadores muestran los tres tipos de selectividad.

La selectividad de los biocatalizadores puede explicarse considerando las interacciones que tiene con el sustrato; sin embargo, al haber una gran diversidad de enzimas y células enteras, y considerando que las condiciones de reacción también afectan notablemente el resultado, es imposible hacer una generalización y cada reacción en particular debe estudiarse detalladamente para obtener los mejores resultados.

### 1.8. Promiscuidad

Otra característica interesante de los biocatalizadores es la llamada *promiscuidad enzimática*, que se define como la capacidad para aceptar varios sustratos estructuralmente distintos o catalizar reacciones diferentes a aquellas en las que participan naturalmente. La idea de promiscuidad enzimática fue introducida en 1976 por Jensen,<sup>50</sup> quien la adjudica a una adaptación evolutiva. Ejemplos notorios de promiscuidad enzimática son la actividad fosfotriesterasa de la quimotripsina, o la capacidad de catalizar sulfoxidaciones en el caso de la mioglobina.

## 1.9. Aumento de la velocidad

Los biocatalizadores, como cualquier otro catalizador, aumentan la velocidad de una reacción al disminuir la energía de activación para un cierto paso. La gran diferencia de la catálisis enzimática con respecto a la catálisis tradicional es que se producen interacciones con el sustrato en sitios no reactivos de la enzima, lo que altera el estado fundamental de éste y coloca al sitio activo en una posición adecuada para reaccionar, en un comportamiento denominado Efecto Circe por el bioquímico estadounidense William Jencks,<sup>51</sup> basándose en la diosa de la mitología griega que transformó en cerdos a los hombres de Ulises.

En los seres vivos, las enzimas suelen generar cambios de varios órdenes de magnitud en los procesos biológicos, como se observa en la tabla 1.1. Tan importante es este cambio que, sin la participación de estos catalizadores, dichos procesos no podrían llevarse a cabo en tiempos adecuados.

**Tabla 1.1.** Comparación de reacciones catalizadas por varias enzimas versus no catalizadas.

*Adaptada de Radzicka et al.<sup>52</sup>*

Enzima	$t_{1/2}$ no enzimático	Constante de velocidad sin enzima $k_{no}$ ( $s^{-1}$ )	Constante de velocidad con enzima $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	Tasa de mejora $k_{cat}/k_{no}$
<b>OMP decarboxilasa</b>	7,8x10 <sup>7</sup> años	2,8x10 <sup>-16</sup>	39	1,4x10 <sup>17</sup>
<b>Adenosina desaminasa</b>	120 años	1,8x10 <sup>-10</sup>	370	2,1x10 <sup>12</sup>
<b>Carboxipeptidasa A</b>	7,3 años	3x10 <sup>-9</sup>	578	1,9x10 <sup>11</sup>
<b>Cetoesteroide isomerasa</b>	7 semanas	1,7x10 <sup>-7</sup>	6,6x10 <sup>4</sup>	3,9x10 <sup>11</sup>
<b>Triosafofato isomerasa</b>	1,9 días	6x10 <sup>-7</sup>	2x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>9</sup>
<b>Corismato mutasa</b>	7,4 h	2,6x10 <sup>-5</sup>	50	1,9x10 <sup>6</sup>
<b>Ciclofilina humana</b>	23 s	2,8x10 <sup>-2</sup>	1,3x10 <sup>4</sup>	4,6x10 <sup>5</sup>
<b>Anhidrasa carbónica</b>	5 s	1,3x10 <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup>	7,7x10 <sup>6</sup>

## 1.10. Clasificación y nomenclatura de las enzimas

Según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por su sigla en inglés), las enzimas pueden nombrarse de dos maneras: una que se denomina trivial, utilizando un prefijo que muestre qué reacción cataliza dicha enzima y el sufijo *-asa* (lipasas hidrolizan lípidos, peptidasas enlaces peptídicos, etc.), y otra sistemática.

La clasificación sistemática consta de cuatro números asignados por la Comisión de Enzimas de la IUBMB antepuestos por la sigla EC (acrónimo de Comisión de Enzimas en inglés) y separados por puntos. El primer número indica la clase de la enzima, y hay seis en total. El segundo número indica la subclase, el tercero la sub-subclase y el cuarto es un número de serie característico de cada enzima. Puede verse en la tabla 1.2 un resumen del sistema de clasificación de la IUBMB.

**Tabla 1.2.** Clasificación sistemática de las enzimas según IUBMB.

Clase	Reacción que cataliza	Subclase
<b>EC 1 (oxidorreductasas)</b>	Reacciones redox	Indica grupo oxidado
<b>EC 2 (transferasas)</b>	Transferencia de grupo funcional	Indica el grupo que se transfiere
<b>EC 3 (hidrolasas)</b>	Hidrólisis	Indica el tipo de enlace que se hidroliza
<b>EC 4 (liasas)</b>	Adición/eliminación no hidrolítica	Indica el enlace que se forma o rompe
<b>EC 5 (isomerasas)</b>	Isomerizaciones	Indica el tipo de isomerización
<b>EC 6 (ligasas)</b>	Formación de enlaces con consumo de ATP	Indica el tipo de enlace que se forma

Así, por ejemplo, las lipasas que hidrolizan triglicéridos son EC 3.1.1.3. Es decir, pertenecen a la clase 3 (hidrolasas, subclase 1 (actúa sobre uniones éster), sub-subclase 1 (hidrólisis de ésteres derivados de ácidos carboxílicos) y su número de serie es 3.

Por otro lado, para poder caracterizar de forma completa una enzima utilizada como biocatalizador, no basta sólo con el código. También debe especificarse la fuente de la cual proviene y, en el caso de encontrarse inmovilizada, las características del soporte.

### 1.11. Enzimas aisladas

El mercado global de las enzimas aisladas es cada vez más lucrativo, estimándose un valor neto de más de cinco mil millones de dólares en el año 2014,<sup>53</sup> siendo probablemente las enzimas hidrolíticas las más utilizadas a nivel industrial<sup>54, 55</sup> (lipasas, proteasas, etc.), debido principalmente a que poseen la gran ventaja de no necesitar cofactores. Sin embargo, en los últimos años numerosos trabajos muestran que la aplicación de otros tipos de biocatalizadores en procesos a gran escala está creciendo de forma exponencial.<sup>56-59</sup>

Las enzimas aisladas y purificadas generalmente se utilizan liofilizadas o inmovilizadas. En este último caso suelen presentar varias ventajas como, por ejemplo, mayor estabilidad, mejor selectividad, mayor concentración en el medio de reacción y la posibilidad de recuperar el biocatalizador del medio de reacción fácilmente mediante filtración.

Existen varios métodos de inmovilización, tanto mediante fenómenos químicos como físicos. Entre los primeros se cuentan la inmovilización por adsorción o por formación de un enlace químico sobre un soporte. Otro tipo de inmovilización que merece una mención es la inmovilización mediante *cross-linking*, en la cual se utilizan moléculas bifuncionales, como por ejemplo dialdehídos o diisocianatos, que forman enlaces con el biocatalizador. Un ejemplo muy notable de este tipo de inmovilización son los *Cross-Linked Enzyme Crystals* o CLECs y los *Cross-Linked Enzyme Aggregates* o CLEAs, ampliamente usados en biocatálisis.<sup>60-62</sup>

Por otro lado, los métodos físicos suelen involucrar el atrapamiento del biocatalizador dentro de una matriz porosa, como por ejemplo alginato, microencapsulación en membranas semipermeables, o la utilización de un reactor de membrana.<sup>63</sup>

En este trabajo se utilizaron dos tipos distintos de enzimas aisladas: lipasas y alcohol deshidrogenasas, tanto liofilizadas como inmovilizadas sobre un soporte.

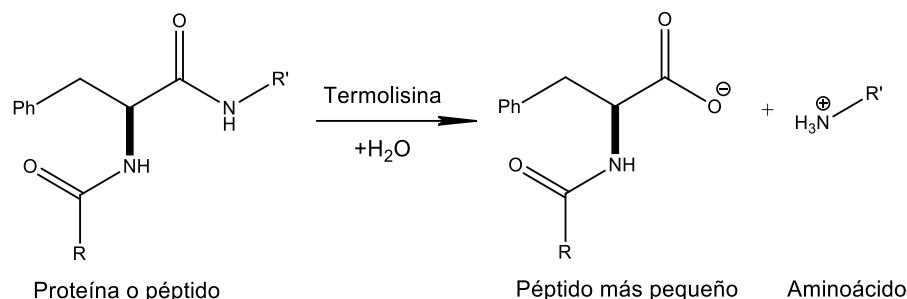
### 1.12. Hidrolasas

Las hidrolasas son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de un enlace en una reacción con agua, siendo la función natural de la mayoría degradar nutrientes en compuestos más pequeños para permitir la digestión. Por ejemplo, las proteasas hidrolizan proteínas en péptidos más pequeños y luego en aminoácidos, como se ve en la figura 1.4.

Hay varias características que hacen que las hidrolasas sean sumamente útiles para el químico orgánico, tanto en investigación, por ejemplo, en la resolución de racematos (Kim *et al.*, Comprehensive Chirality 2012), como en la industria, donde podrían utilizarse en la manufactura de

papel (Reid *et al.*, Progress in Biotechnology 2002). Debido a su gran promiscuidad, las hidrolasas pueden aceptar como sustratos varios intermediarios sintéticos. Además, suelen mostrar una alta estereoselectividad, incluso con sustratos no naturales. Por último, además de reacciones de hidrólisis, las hidrolasas pueden catalizar otras reacciones, como condensaciones y alcoholisis.

Por otro lado, resulta muy práctico el hecho de que es posible encontrar un gran número de hidrolasas comerciales que no requieren cofactores y son estables en varios solventes orgánicos.



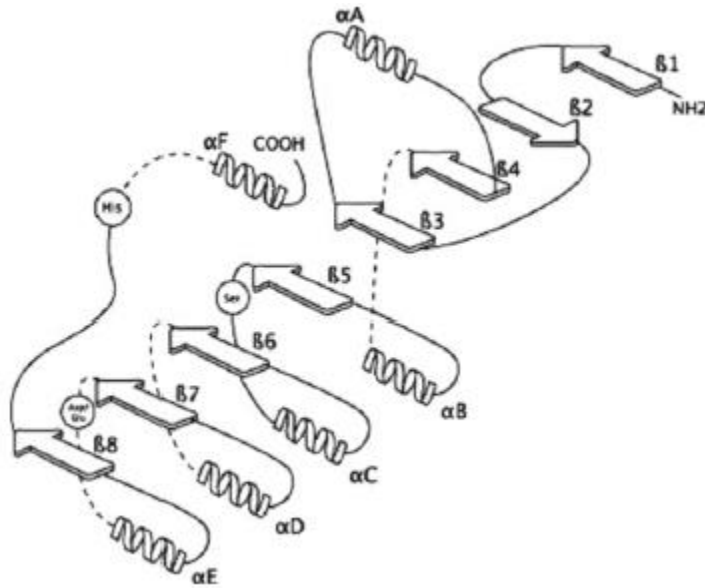
**Figura 1.4.** Reacción catalizada naturalmente por Termolisina, una proteasa propia de bacterias termofílicas.

### 1.13.Lipasas

Parte del trabajo descrito en este libro se llevó a cabo utilizando lipasas, un tipo de enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas, definidas como triacilglicerol acilhidrolasas (EC 3.1.1.3).

Estructuralmente, las lipasas son  $\alpha,\beta$ -hidrolasas, generalmente compuestas por ocho láminas beta paralelas, que se ubican en una posición central, siendo sólo la segunda lámina antiparalela ( $\beta_2$ ). Las láminas  $\beta_3$ - $\beta_8$  se encuentran conectadas por  $\alpha$  hélices situadas a los lados de la estructura central de láminas  $\beta$ , como se detalla en la figura 1.5. Otra característica estructural de las lipasas es la presencia de puentes disulfuro, que les confieren estabilidad y participan indirectamente de su actividad catalítica.

La tríada catalítica del sitio activo se encuentra conservada entre lipasas, y está compuesta por serina, como nucleófilo, histidina y aspartato o glutamato como residuo ácido.<sup>65, 66</sup> Por otro lado, otros dos residuos, que varían según la lipasa, forman lo que se denomina hueco oxianión. Estos aminoácidos estabilizan el estado de transición formado durante el proceso catalítico, mediante la formación de puentes de hidrógeno entre el protón de amida perteneciente al *backbone* y el oxígeno carbonílico del sustrato.



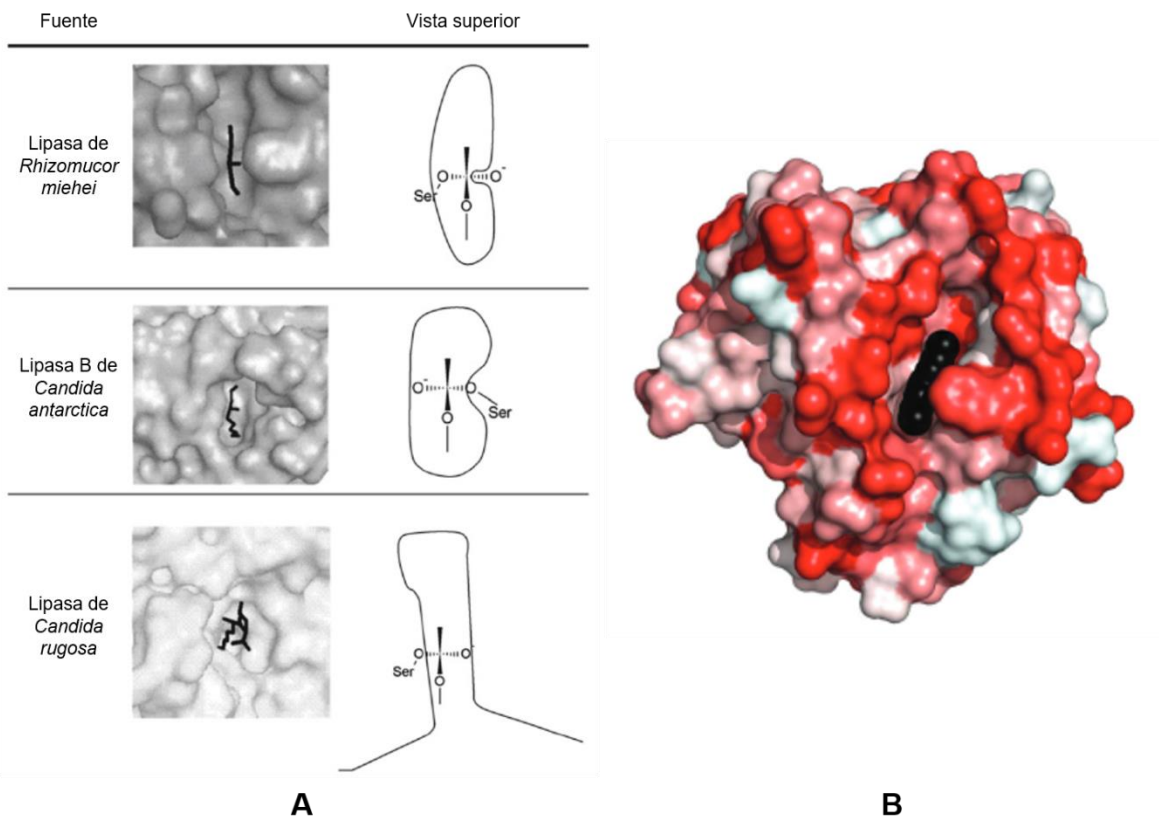
**Figura 1.5.** Esquema de una lipasa donde las  $\alpha$  hélices están representadas por espirales y las láminas  $\beta$  por flechas. Adaptada de Jaeger et al.<sup>64</sup>

El sitio activo de las lipasas se encuentra dentro de un bolsillo hidrofóbico, en la punta de la estructura central de láminas  $\beta$ . Éstos difieren en forma, tamaño, profundidad y características fisicoquímicas de los aminoácidos que lo componen, siendo posible clasificarlos en tres grupos distintos según su geometría, como se observa en la figura 1.6. A.

Naturalmente, las lipasas catalizan la hidrólisis del enlace éster en triacilgliceroles, formando ácidos grasos y glicerol. Estos sustratos son poco solubles en agua, por lo que la reacción normalmente ocurre en la interfaz de un sistema bifásico compuesto por una fase acuosa y una orgánica. Curiosamente, la mayoría de las lipasas actúa aún mejor en estas condiciones que en una solución acuosa con el sustrato disuelto, en un fenómeno conocido como activación interfacial.<sup>67-69</sup>

La hipótesis mayormente aceptada para explicar el mecanismo de la activación interfacial es que el sitio activo de la enzima en una solución acuosa se encuentra cubierto por una región flexible de la molécula proteica, comúnmente llamada “tapa”, o “lid” por su nombre en inglés. La interacción con una fase hidrofóbica genera la apertura de esta “tapa”, exponiendo al sitio activo. Esta hipótesis es sustentada por imágenes de las estructuras cristalinas de varias lipasas, algunas de las cuales muestran una forma cerrada,<sup>70, 71</sup> y otras una forma abierta,<sup>72</sup> como se observa en la figura 1.6. B.





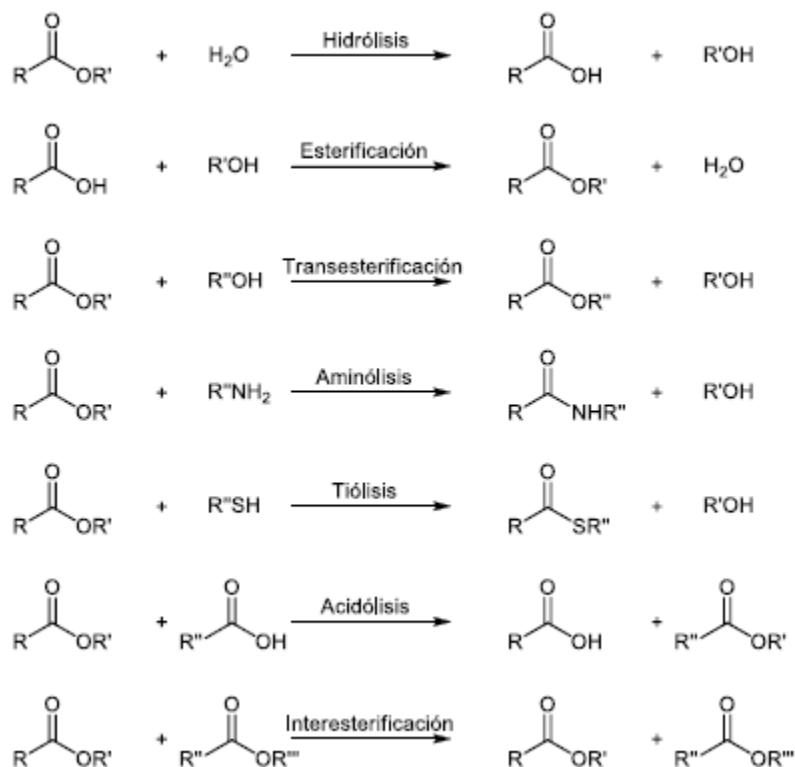
**Figura 1.6. A.** Forma de los tres tipos de bolsillo hidrofóbico según Pleiss et al.<sup>31</sup>. Adaptada de Casas-Godoy et al.<sup>65</sup> **B.** Detalle de la forma “abierta” de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML, estructura PDB 4TGL). En negro se observa el inhibidor co-cristalizado con la enzima, ubicado sobre el sitio activo. La intensidad de color rojo indica la hidrofobicidad de acuerdo con Eisenberg et al.<sup>73</sup>

Cabe destacar que también pueden encontrarse casos particulares donde una lipasa tiene dos “tapas”<sup>74</sup> o ninguna,<sup>75, 76</sup> teniendo como consecuencia que en este último caso la enzima no muestre activación interfacial.

La capacidad de las lipasas para aceptar sustratos hidrofóbicos las ha hecho sumamente atractivas para su aplicación en síntesis orgánica, siendo capaces de catalizar una gran variedad de reacciones como puede verse en la figura 1.7.<sup>77</sup>

Como se mencionó anteriormente, las enzimas muchas veces muestran un comportamiento quimio-, regio- y estereoselectivo, y las lipasas no son la excepción. La quimio- y regioselectividad están directamente influenciadas por la forma del bolsillo hidrofóbico y los aminoácidos que lo componen.

Quizás la característica más importante de los biocatalizadores sea su estereoselectividad, y, en particular, su enantioselectividad, y es por eso que se ha estudiado exhaustivamente cómo predecir este comportamiento. En el caso de las lipasas, se propuso una regla empírica basada en el tamaño relativo de los sustituyentes en el estereocentro para la reacción de lipasas con alcoholes secundarios, comúnmente llamada regla de Kazlauskas.<sup>78</sup> Lamentablemente, se demostró que esta regla no es confiable para alcoholes primarios y derivados de ácidos carboxílicos.

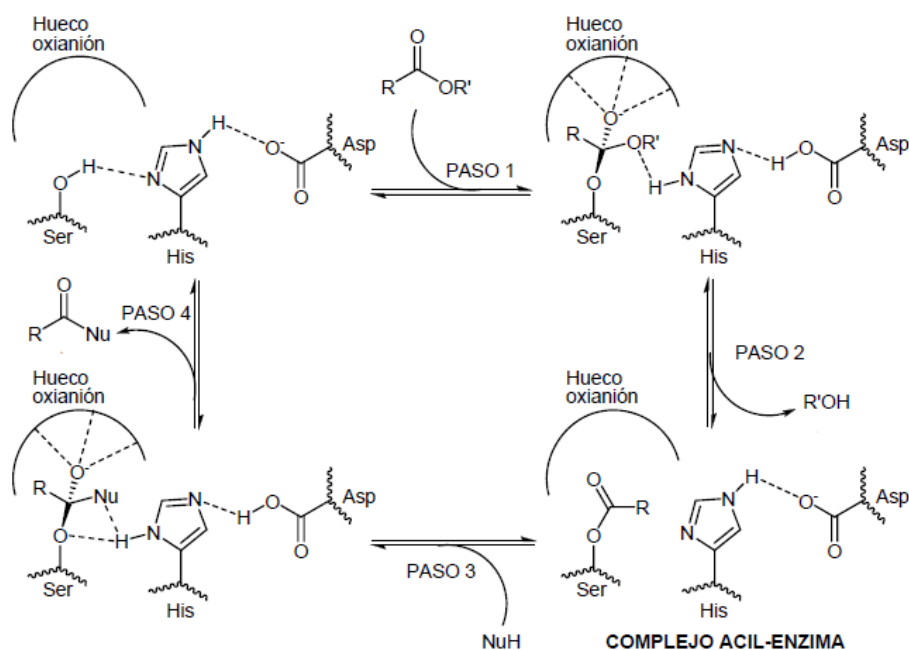


**Figura 1.7.** Ejemplos de reacciones catalizadas por lipasas.

Mediante estudios de rayos X se consiguió resolver la estructura del complejo enzima-sustrato, lo cual permitió llevar adelante estudios de modelado molecular y docking. De esta manera, fue posible comparar lipasas bacterianas de varias fuentes y obtener parámetros importantes del sitio activo.<sup>79</sup>  
<sup>80</sup> Esto llevó a la conclusión de que más allá de la interacción que el sustrato tenga con la enzima, su comportamiento estereoquímico depende también de factores fisicoquímicos, tales como la temperatura y el solvente utilizado. En conclusión, por ahora la enantioselectividad no puede ser explicada mediante análisis estructurales ni energéticos, por lo que cada reacción debe ser estudiada separadamente.

### 1.14. Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de las lipasas puede resumirse en cuatro etapas, tal como se muestra en la figura 1.8. Comienza con una acilación, debido a la transferencia de un protón entre los residuos aspartato/glutamato, histidina y serina presentes en el sitio activo, lo cual provoca la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica. Como consecuencia, se produce un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina sobre el grupo carbonilo del sustrato, formándose un intermediario tetraédrico estabilizado por puentes de hidrógeno formados con los residuos del hueco oxianión. Luego de este paso se produce la eliminación de una molécula de alcohol, generándose un complejo acil-enzima que, al ser atacado por un nucleófilo forma un nuevo complejo tetraédrico. Éste, en un último paso libera el producto de reacción, volviendo a comenzar el ciclo.



**Figura 1.8.** Ciclo catalítico de las lipasas.

### 1.15. Oxidorreductasas

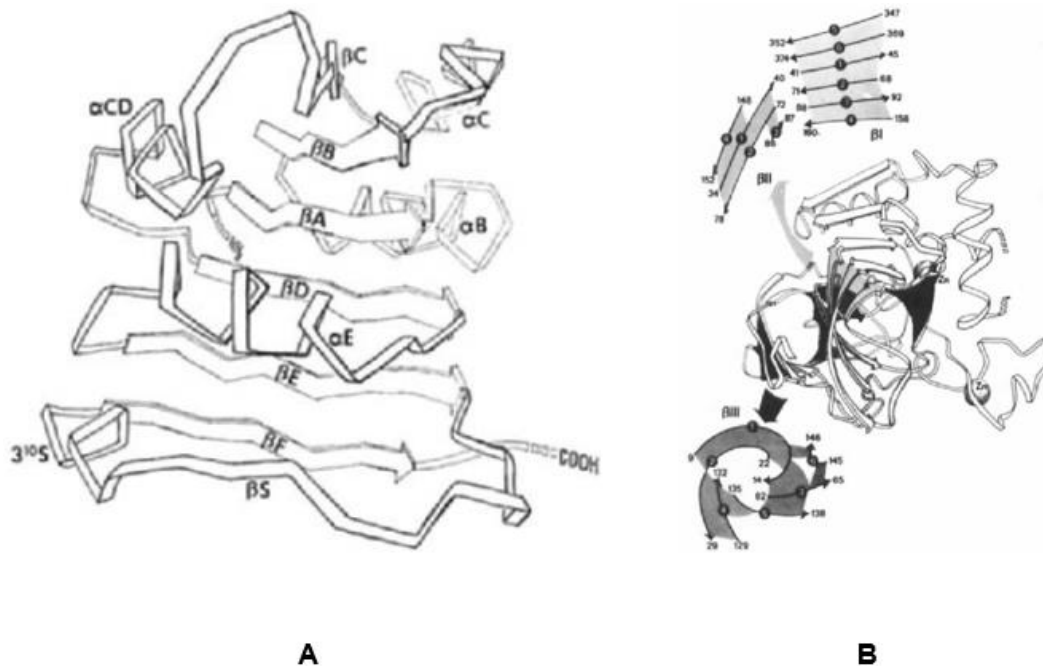
Se denominan oxidorreductasas a las enzimas que catalizan reacciones de oxidación/reducción, por lo que éste es uno de los grupos más grandes y variados de biocatalizadores. Debido a los múltiples usos posibles para las oxidorreductasas, desde hace tiempo son uno de los principales campos de interés de la biocatálisis.<sup>81-83</sup> Sin embargo, una desventaja de las oxidorreductasas es que requieren de cofactores para poder catalizar reacciones redox, lo cual tiende a incrementar los costos en un

proceso industrial. Estos cofactores, generalmente NADH o NADPH, son demasiado costosos para ser usados en cantidades estequiométricas, por lo que es de vital importancia desarrollar métodos para su regeneración *in situ* o nuevos cofactores sintéticos de menor costo.<sup>84, 85</sup>

### 1.16. Alcohol deshidrogenasas

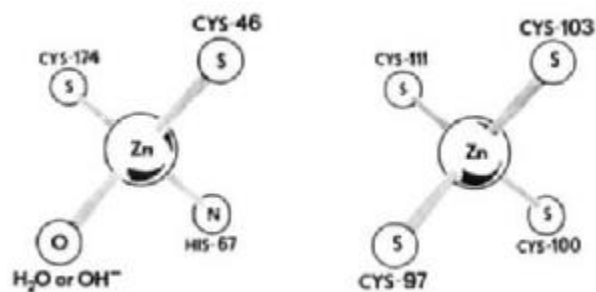
Las alcohol deshidrogenasas (ADHs, EC 1.1.1.1) son oxidorreductasas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes a aldehídos o cetonas, con la reducción de un cofactor nicotinamida.<sup>86</sup> Son ubicuas en todos los organismos y pueden dividirse en tres grupos no homólogos: isoenzimas para cadena larga/media que contienen zinc (ADH de grupo I), isoenzimas para cadena corta sin metales (grupo II) e isoenzimas que contienen hierro (grupo III).<sup>87</sup> En particular, en este trabajo de tesis doctoral se usó alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH), una oxidorreductasa NAD<sup>+</sup> dependiente, activa en una gran variedad de alcoholes primarios, secundarios, ramificados y cíclicos.<sup>88</sup>

Esta enzima es un dímero que, a su vez, presenta tres isoenzimas posibles, resultantes de la combinación de dos subunidades muy similares pero que difieren en diez aminoácidos,<sup>89</sup> denominadas como E (activa para etanol) y S (activa para esteroides, steroids en inglés). Notablemente, estas subunidades son inactivas como monómeros.<sup>90-92</sup> Por lo tanto, hay tres posibles especies para esta enzima, EE, SS y ES, siendo EE el componente mayoritario en preparaciones comerciales. Cada subunidad contiene dos átomos de zinc, de los cuales uno participa del ciclo catalítico, y el otro juega un rol crucial para la estabilidad proteica.<sup>93</sup> Por otro lado, cada subunidad se encuentra dividida en dos dominios separados por un bolsillo profundo, donde se encuentra el sitio activo. Uno de estos dominios se une al cofactor, mientras que el otro contiene los átomos de zinc y el sitio catalítico. El dominio de unión al cofactor está compuesto por seis láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por hélices  $\alpha$  siguiendo un patrón regular, mientras que el dominio catalítico consiste en un complicado entramado de láminas  $\beta$  donde pueden diferenciarse tres regiones llamadas  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\beta$ III, como se ve en la figura 1.9.



**Figura 1.9.** Esquema del sitio de unión al cofactor de las ADH de tipo I (A) y del dominio catalítico, incluyendo los átomos de zinc (B). Adaptado de Brändén et al.<sup>92</sup>

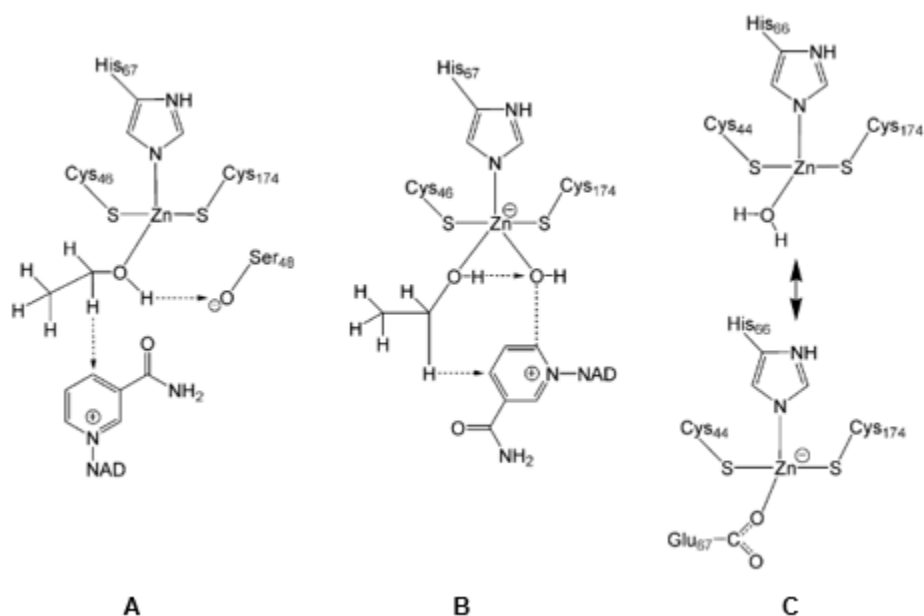
Como se mencionó anteriormente, el sitio catalítico de la enzima, que contiene un átomo de zinc, se encuentra al final de un bolsillo hidrofóbico que separa los dos dominios de la subunidad. Este átomo de zinc se encuentra coordinado de forma tetraédrica distorsionada por dos cisteínas, una histidina y una molécula de  $\text{H}_2\text{O}/\text{HO}^-$  (dependiendo del pH). Por otro lado, el átomo de zinc que mantiene la estabilidad estructural se encuentra rodeado por cuatro cisteínas, formando también un tetraedro distorsionado, tal como se detalla en la figura 1.10.



**Figura 1.10.** Diagrama esquemático de los ligandos de los dos átomos de zinc de cada subunidad de HLADH. Adaptado de Brändén et al.<sup>92</sup>

### 1.17. Mecanismo catalítico

A pesar de numerosas investigaciones, el mecanismo catalítico exacto de las ADHs dependientes de zinc aún no ha sido elucidado completamente a un nivel molecular. Sin embargo, se conocen varios de los procesos involucrados. Inicialmente, el cofactor se une al dominio correspondiente, con la cara activa del anillo de nicotinamida orientada hacia el zinc catalítico.<sup>94-96</sup> Esta unión es acompañada por un cambio conformacional muy grande en la proteína, lo que provoca la expulsión del agua residual presente en el sitio activo y la generación del ambiente hidrofóbico necesario para que ocurra una transferencia de hidruro.<sup>97</sup>



**Figura 1.11.** Diferentes complejos de zinc propuestos para el mecanismo oxidativo de HLADH. **(A)** Mecanismo “clásico”; **(B)** Zn pentacoordinado con la molécula de agua participando de la reacción; **(C)** Residuo Glu-67 o Glu-68 unido al Zn intermitentemente. Adaptado de Dołęga.<sup>102</sup>

Luego, se produce la unión del sustrato al zinc catalítico, formando un complejo para el cual se han propuesto varias teorías. Generalmente se acepta que el alcohol se compleja directamente al Zn. Sin embargo, se han planteado dudas sobre qué ocurre con la molécula de agua originalmente complejada a ese núcleo metálico. Tradicionalmente se pensó que el agua era desplazada del sitio activo al producirse la unión del alcohol al Zn,<sup>98</sup> mas estudios posteriores sugieren la formación de un complejo pentacoordinado en el cual la molécula de agua participa de la reacción,<sup>99</sup> o también la inversión de la coordinación del Zn debido a la interacción con un residuo Glu, que podría ajustar la

carga parcial del Zn y acelerar así el intercambio de ligandos durante el ciclo catalítico.<sup>100, 101</sup> En la figura 1.11. se esquematizan los diferentes complejos postulados para la reacción de deshidrogenación de alcoholes catalizada por esta enzima.

El proceso detallado anteriormente es seguido de la disociación del protón del grupo hidroxilo del alcohol y su transporte fuera del sitio catalítico mediante una red de puentes de hidrógeno, produciéndose una transferencia de hidruro del alcoholato unido al zinc al anillo nicotinámico del cofactor mediante efecto túnel.<sup>103, 104</sup>

Finalmente, el aldehído formado sale del sitio activo y es reemplazado por una molécula de agua, continuando con la apertura del sitio catalítico y liberación del cofactor reducido.<sup>102</sup>

Todos los pasos detallados en esta sección pueden resumirse en la siguiente ecuación:



### 1.18. Origen natural de las lipasas y las alcohol deshidrogenasas

Tanto las lipasas como las ADHs son enzimas sumamente ubicuas, producidas por una gran variedad de organismos.

En el caso de las lipasas, éstas son encontradas más abundantemente en flora microbiana, incluyendo bacterias, hongos y levaduras, donde la producción de lipasas es principalmente regulada por factores ambientales, siendo producidas como una respuesta extracelular a un medio pobre en nutrientes.<sup>105-108</sup> Éstas son las lipasas más utilizadas en el campo de la biotecnología, siendo *Candida* spp., *Pseudomonas* spp. y *Rhizopus* spp. las cepas más comunes para su producción.<sup>109</sup>

Por otro lado, la mayoría de las lipasas animales provienen del páncreas de mamíferos como ovejas o cerdos, mientras que en el caso de las plantas las lipasas se encuentran principalmente en las semillas. Estas últimas son utilizadas para hidrolizar triglicéridos de reserva necesarios para la germinación,<sup>110</sup> aunque también juegan un importante rol en el metabolismo de la clorofila, la maduración de las frutas, e incluso se ha postulado que pueden ser parte del mecanismo de ciertas plantas contra patógenos.<sup>111, 112</sup>

Las ADHs son enzimas esenciales para los seres vivos que tienen un rol preponderante en el metabolismo del alcohol, por lo que se encuentran ampliamente conservadas.

Algunas de las ADHs más utilizadas provienen del hígado de mamíferos, como la utilizada en esta tesis que proviene del caballo, aunque también están presentes en otros órganos. También es común

encontrar trabajos donde se utilizan ADHs provenientes de levaduras, bacterias, hongos, insectos, y muchísimos otros organismos.<sup>113-116</sup> Por último, cabe destacar que se han hallado ribozimas con actividad de alcohol deshidrogenasa.<sup>117</sup>

### **1.19. Aplicaciones biotecnológicas de las lipasas y las alcohol deshidrogenasas**

Debido a la especificidad de las lipasas, que reduce, o incluso elimina, el número de productos secundarios en un proceso de varias etapas, su excelente estabilidad en varios solventes y también gracias a que no precisan cofactores, estas enzimas han demostrado ser una alternativa excelente a las técnicas clásicas de síntesis orgánica para la transformación de numerosos sustratos, y por eso se utilizan ampliamente en diversas disciplinas.

En la industria alimentaria, se utilizan comúnmente en la manufactura de numerosos productos con fines variados, siendo algunas de las aplicaciones más importantes la modificación de grasas, aceites y compuestos derivados con el fin de mejorar las propiedades organolépticas del alimento, o también su conservación.<sup>118-123</sup>

Debido a la capacidad de las lipasas para llevar adelante reacciones de forma selectiva en distintos solventes orgánicos, y también a su gran promiscuidad, estas enzimas han emergido como importantes biocatalizadores para aplicaciones biomédicas y también para la fabricación de pesticidas, especialmente para la obtención de compuestos quirales con un buen exceso enantiomérico, o la resolución de mezclas racémicas.<sup>124-129</sup>

Las lipasas también se utilizan exitosamente en muchas otras aplicaciones, tales como la fabricación de biosensores para distintos sustratos,<sup>130-132</sup> la manufactura de detergentes, cuero y cosméticos,<sup>133-135</sup> así como también en biorremediación.<sup>136, 137</sup>

En el caso de las ADHs, la necesidad de regenerar el cofactor ha hecho que aún no haya tantas aplicaciones a nivel industrial en comparación con las lipasas. Sin embargo, debido a su excelente estereoselectividad, se utilizan en gran medida para la resolución dinámica de mezclas racémicas y también para sintetizar productos con un alto grado de pureza óptica,<sup>138-141</sup> por lo que llevar estos procesos a una escala mayor es un área de estudio en constante crecimiento.

### **1.20. Modelado molecular**

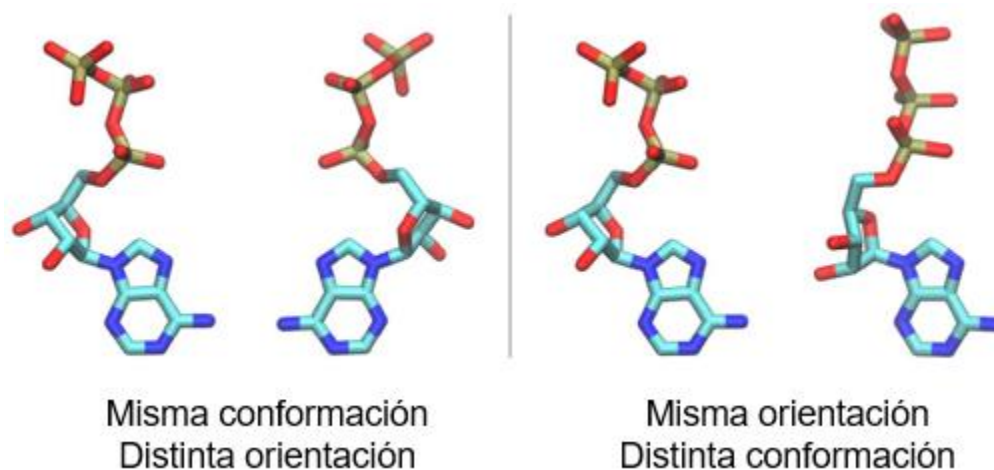
Los avances realizados en biología estructural permitieron revelar la estructura tridimensional de muchos biocatalizadores. El modelado molecular es la herramienta que permite conectar esa información estructural con observaciones experimentales.



En particular, el *docking* molecular es una técnica computacional que permite identificar el modo de unión de dos moléculas que forman un complejo. Ésto significa, para el caso de complejos proteína-ligando, identificar las posibles *poses* de un ligando dado en un sitio de unión de la proteína o receptor para luego identificar cuál es más favorable energéticamente y así establecer un orden de afinidades del sitio para ligandos que sean química o estructuralmente similares.

Para lograr este objetivo, los programas de *docking* necesitan un algoritmo de búsqueda (heurístico, ya que no es posible considerar todas las posibilidades) que halle diferentes *poses* del ligando, además de una función de puntaje para estimar la afinidad de cada *pose* y seleccionar aquellas energéticamente más favorables.

La *pose* de un ligando integra tanto la orientación del ligando respecto del receptor como la conformación intrínseca del ligando, como se muestra en la figura 1.12. para la molécula de ATP.



**Figura 1.12.** Distintas poses para una molécula de ATP.

La conformación del ligando dependerá de la capacidad de rotación de sus enlaces, llamándose *torsiones* a los enlaces simples rotables. Cuanto mayor sea el número de torsiones, mayor será también el número de conformaciones posibles, lo que se traduce en un mayor tiempo de cómputo.

Por otro lado, hay distintas maneras de construir funciones de puntaje; pueden ser con base fisicoquímica, potenciales estadísticos o empíricos.

En esta tesis se utilizó el programa AutoDock,<sup>142</sup> que es un software gratuito y ampliamente utilizado por la comunidad científica. La función de puntaje que utiliza AutoDock sigue un enfoque mixto que combina un potencial con base fisicoquímica similar a un campo de fuerzas, cuyos parámetros son luego ajustados a información experimental. Por este motivo, se dice que su función es semiempírica.

Para calcular la energía de las distintas poses se utilizan grillas de energía que delimitan una región del espacio, la cual puede abarcar total o parcialmente al área de interés de la proteína dentro de un cubo o un prisma rectangular que definirá la zona en la que tendrá lugar el cálculo. Luego, previo a la simulación de docking, se evalúa la energía que aportarían los distintos átomos que componen al ligando desplazando átomos de prueba a lo largo de los puntos de la grilla y generando así mapas energéticos. Se crea un mapa por cada tipo de átomo, y se agrega un mapa electrostático y uno de desolvatación, los cuales luego se combinan matemáticamente de acuerdo con la ocupación espacial del ligando para determinar el puntaje de la pose dada. La grilla consiste, entonces, en una serie de puntos discretos en el espacio que contienen la información del puntaje energético que resultaría de colocar allí cualquiera de los átomos del ligando.

### **1.21. Síntesis química de antiparasitarios utilizando ácidos fenilborónicos**

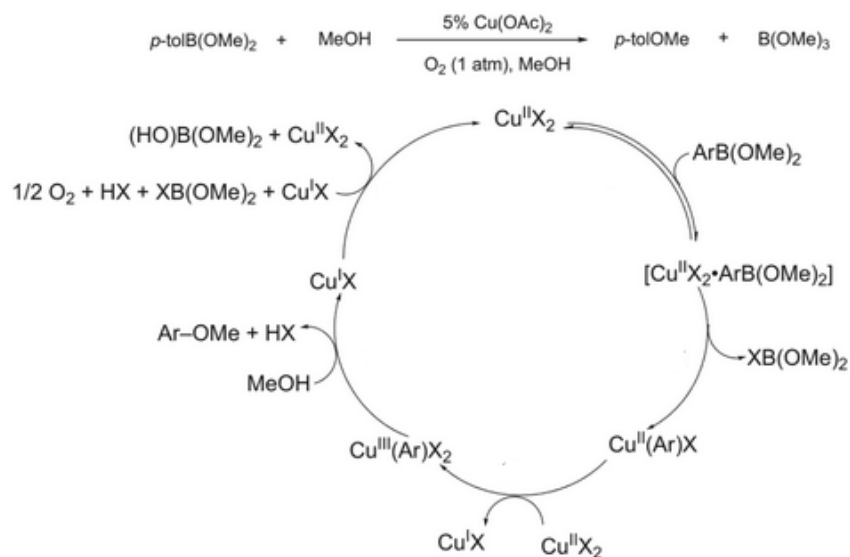
En este trabajo de tesis doctoral también se llevó adelante la síntesis de una serie de agentes antiparasitarios derivados de quinolina, utilizando una reacción de acoplamiento con ácidos borónicos conocida como reacción de Chan-Lam.<sup>143</sup>

Los ácidos borónicos son conocidos reactivos para la formación de enlaces entre carbono y distintos heteroátomos; de la misma manera, los ácidos fenilborónicos son agentes arilantes eficientes en condiciones suaves en presencia de un catalizador metálico.<sup>143-145</sup>

En los últimos años ha habido numerosos estudios acerca del mecanismo de esta reacción, sin llegar a un acuerdo definitivo, hecho que probablemente se debe a que distintos tipos de sustratos actúan según mecanismos diversos.<sup>146</sup>

Estudios cinéticos y espectroscópicos realizados para la metoxilación de un éster toliborónico<sup>147</sup> revelaron un mecanismo complejo de varias etapas, en el cual el cobre catalítico cambia su estado de oxidación y también sus ligandos de coordinación varias veces, tal como se muestra en la figura 1.13.

Adicionalmente, se ha demostrado también que el complejo arilo-Cu(III) que se forma reacciona fácilmente con nitrógenos nucleofílicos de amina para dar acoplamientos, incluso en ausencia de otra base.



**Figura 1.13.** Mecanismo propuesto para la metoxilación de un éster *p*-tolilborónico. Adaptado de Lam.<sup>146</sup>

## 1.22. Conclusiones

En este capítulo se han presentado a quienes serán los grandes protagonistas de esta tesis, haciendo especial hincapié en el área de mayor *expertise* tanto mía como del laboratorio, que es la biocatálisis.

Esta disciplina, como se desprende de la lectura anterior, es sumamente amplia y diversa. Es aplicable tanto a proyectos de investigación básica, así como a grandes plantas industriales, y cada vez se entremezcla y se enriquece más con conocimientos provenientes de otras disciplinas, como por ejemplo las técnicas de modelado molecular.

A pesar de su rica historia, aún hoy (¡afortunadamente!) en biocatálisis se presentan muchísimos desafíos por resolver y procesos por mejorar, lo que la convierte en una disciplina apasionante que parece estar muy lejos de encontrar su techo.

En los capítulos siguientes de este libro se encuentra detallado cómo he intentado humildemente, y no siempre con éxito, subir algunos escalones (escaloncitos) hacia ese techo. Espero que lo disfruten tanto como yo.

## **Bibliografía**

1. Kumar, D., *Genomics and health in the developing world*. Oxford University Press: 2012.
2. Wisniak, J., The history of catalysis. From the beginning to Nobel Prizes. *Educación química* **2010**, 21 (1), 60-69.
3. Fulhame, M., *An essay on combustion: with a view to a new art of dying and painting. Wherein the phlogistic and antiphlogistic hypotheses are proven erroneous*. Printed for the author, by J. Cooper: 1794.
4. Asimov, I.; Cruz, A.; Villena, M. I., *Breve historia de la química*. Alianza: 1975.
5. Corradini, P.; Guerra, G.; Cavallo, L., Do New Century Catalysts Unravel the Mechanism of Stereocontrol of Old Ziegler– Natta Catalysts? *Accounts of chemical research* **2004**, 37 (4), 231-241.
6. Lengeler, J. W.; Drews, G.; Schlegel, H. G., *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag: 1999.
7. Gupta, S.; Bhattacharya, A.; Murthy, C., Tune to immobilize lipases on polymer membranes: techniques, factors and prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2013**, 2 (3), 171-190.
8. Bailey, J. E., Chemical engineering of cellular processes. *Chemical engineering science* **1995**, 50 (24), 4091-4108.
9. Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R., Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *cell* **1982**, 31 (1), 147-157.
10. Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S., The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **1983**, 35 (3), 849-857.
11. Faber, K.; Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. Springer: 1992; Vol. 4.
12. Bommarius, A. S.; Riebel-Bommarius, B. R., *Biocatalysis: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons: 2004.
13. Larson, G.; Piperno, D. R.; Allaby, R. G.; Purugganan, M. D.; Andersson, L.; Arroyo-Kalin, M.; Barton, L.; Climer Vigueira, C.; Denham, T.; Dobney, K.; Doust, A. N.; Gepts, P.; Gilbert, M. T. P.; Gremillion, K. J.; Lucas, L.; Lukens, L.; Marshall, F. B.; Olsen, K. M.; Pires, J. C.; Richerson, P. J.; Rubio de Casas, R.; Sanjur, O. I.; Thomas, M. G.; Fuller, D. Q., Current perspectives and the future of domestication studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, 111 (17), 6139-6146.
14. McGovern, P. E., *Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. Univ of California Press: 2009.
15. Silanikove, N.; Leitner, G.; Merin, U., The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients* **2015**, 7 (9), 7312-7331.

16. Arranz-Otaegui, A.; Carretero, L. G.; Ramsey, M. N.; Fuller, D. Q.; Richter, T., Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115* (31), 7925-7930.
17. Cagnard-Latour, C., Mémoire sur la fermentation vineuse: présenté à L' Académie des Sciences, le juin 1837. *Comptes rendus des séances de l' Académie des Sciences, le 10 octobre 1838* **1838**.
18. Schwann, T., Vorläufige Mittheilung, betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulniss. *Annalen der Physik* **1837**, *117* (5), 184-193.
19. Kützing, F., Microscopische Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter, nebst mehreren andern dazu gehörigen vegetabilischen Gebilden. *Journal für praktische Chemie* **1837**, *11* (1), 385-409.
20. Payen, A.; Persoz, J.-F., Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions, et leurs applications aux arts industriels. *Ann. chim. phys* **1833**, *53*, 73-92.
21. Sumner, J. B., The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry* **1926**, *69* (2), 435-441.
22. Pauling, L.; Corey, R. B., Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1951**, *37* (11), 729.
23. Yuryev, R.; Liese, A., Biocatalysis: the outcast. *ChemCatChem* **2010**, *2* (1), 103-107.
24. Khmel'nitsky, Y. L.; Rich, J. O., Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Current opinion in chemical biology* **1999**, *3* (1), 47-53.
25. Yang, Z.; Pan, W., Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *37* (1), 19-28.
26. Sym, E. A., Action of esterase in the presence of organic solvents. *Biochemical Journal* **1936**, *30* (4), 609.
27. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82* (10), 3192-3196.
28. Zaks, A.; Klibanov, A. M., Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science* **1984**, *224* (4654), 1249-1251.
29. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *nature* **2001**, *409* (6817), 241-246.
30. Fitzpatrick, P. A.; Steinmetz, A.; Ringe, D.; Klibanov, A. M., Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, *90* (18), 8653-8657.
31. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and physics of lipids* **1998**, *93* (1-2), 67-80.
32. Yennawar, N. H.; Yennawar, H. P.; Farber, G. K., X-ray Crystal Structure of gamma-Chymotrypsin in Hexane. *Biochemistry* **1994**, *33* (23), 7326-7336.

33. Trodler, P.; Pleiss, J., Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC structural biology* **2008**, *8* (1), 9.
34. Tyagi, S.; Pleiss, J., Biochemical profiling in silico—predicting substrate specificities of large enzyme families. *Journal of biotechnology* **2006**, *124* (1), 108-116.
35. Klibanov, A. M., Enzyme stabilization by immobilization. *Analytical biochemistry* **1979**, *93*, 1-25.
36. Sheldon, R. A., Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2007**, *349* (8-9), 1289-1307.
37. Kierstan, M.; Bucke, C., The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XIX, No. 3, Pages 387-397 (1977). 2000.
38. Jahnz, U.; Wittlich, P.; Prüsse, U.; Vorlop, K.-D., New matrices and bioencapsulation processes. In *Engineering and manufacturing for biotechnology*, Springer: 2001; pp 293-307.
39. Li, W.; Du, W.; Liu, D., Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2007**, *45* (3-4), 122-127.
40. Mesiano, A. J.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., Supercritical biocatalysis. *Chemical Reviews* **1999**, *99* (2), 623-634.
41. Sureshkumar, M.; Lee, C.-K., Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *60* (1-2), 1-12.
42. Zhang, Q.; Vigier, K. D. O.; Royer, S.; Jérôme, F., Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (21), 7108-7146.
43. Guajardo, N.; Mueller, C. R.; Schrebler, R.; Carlesi, C.; Dominguez de Maria, P., Deep eutectic solvents for organocatalysis, biotransformations, and multistep organocatalyst/enzyme combinations. *ChemCatChem* **2016**, *8* (6), 1020-1027.
44. Alonso, D. A.; Baeza, A.; Chinchilla, R.; Guillena, G.; Pastor, I. M.; Ramón, D. J., Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016* (4), 612-632.
45. Abbott, A. P.; Capper, G.; Davies, D. L.; Rasheed, R. K.; Tambyrajah, V., Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications* **2003**, (1), 70-71.
46. Gorke, J. T.; Sreenc, F.; Kazlauskas, R. J., Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chemical Communications* **2008**, (10), 1235-1237.
47. Liu, P.; Hao, J.-W.; Mo, L.-P.; Zhang, Z.-H., Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Advances* **2015**, *5* (60), 48675-48704.
48. Pätzold, M.; Siebenhaller, S.; Kara, S.; Liese, A.; Syltatk, C.; Holtmann, D., Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends in biotechnology* **2019**.

49. Kim, S. H.; Park, S.; Yu, H.; Kim, J. H.; Kim, H. J.; Yang, Y.-H.; Kim, Y. H.; Kim, K. J.; Kan, E.; Lee, S. H., Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, *128*, 65-72.
50. Jensen, R. A., Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annual review of microbiology* **1976**, *30* (1), 409-425.
51. Jencks, W. P., Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: the circe effect. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **1975**, *43*, 219-410.
52. Radzicka, A.; Wolfenden, R., A proficient enzyme. *Science* **1995**, *267* (5194), 90-93.
53. Kumar, V.; Sangwan, P.; Singh, D.; Gill, P., Global scenario of industrial enzyme market. *Industrial enzymes: trends, scope and relevance*. Nova Science Publishers, New York **2014**, 176-196.
54. Schmid, A.; Dordick, J.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B., Industrial biocatalysis today and tomorrow. *nature* **2001**, *409* (6817), 258-268.
55. Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J., *Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons: 2006.
56. Martinez, A. T.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Camarero, S.; Serrano, A.; Linde, D.; Lund, H.; Vind, J.; Tovborg, M.; Herold-Majumdar, O. M.; Hofrichter, M., Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology advances* **2017**, *35* (6), 815-831.
57. Wachtmeister, J.; Rother, D., Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Current opinion in biotechnology* **2016**, *42*, 169-177.
58. Fuchs, M.; Farnberger, J. E.; Kroutil, W., The industrial age of biocatalytic transamination. *European journal of organic chemistry* **2015**, *2015* (32), 6965-6982.
59. Tataruch, M.; Heider, J.; Bryjak, J.; Nowak, P.; Knack, D.; Czerniak, A.; Liesiene, J.; Szalaniec, M., Suitability of the hydrocarbon-hydroxylating molybdenum-enzyme ethylbenzene dehydrogenase for industrial chiral alcohol production. *Journal of biotechnology* **2014**, *192*, 400-409.
60. Arroyo, M., Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* **1998**, *39* (2), 23-39.
61. Häring, D.; Schreier, P., Cross-linked enzyme crystals. *Current Opinion in Chemical Biology* **1999**, *3* (1), 35-38.
62. Velasco-Lozano, S.; López-Gallego, F.; Mateos-Díaz, J. C.; Favela-Torres, E., Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement—a review. *Biocatalysis* **2016**, *1* (1), 166-177.
63. Mallin, H.; Muschiol, J.; Byström, E.; Bornscheuer, U. T., Efficient biocatalysis with immobilized enzymes or encapsulated whole cell microorganism by using the SpinChem reactor system. *ChemCatChem* **2013**, *5* (12), 3529-3532.
64. Jaeger, K.; Dijkstra, B.; Reetz, M., Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology* **1999**, *53* (1), 315-351.

65. Casas-Godoy, L.; Duquesne, S.; Bordes, F.; Sandoval, G.; Marty, A., Lipases: an overview. In *Lipases and phospholipases*, Springer: 2012; pp 3-30.
66. Winkler, F.; d'Arcy, A.; Hunziker, W., Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **1990**, *343* (6260), 771-774.
67. Sarda, L.; Desnuelle, P., Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochimica et Biophysica Acta* **1958**, *30* (3), 513-521.
68. Anthonsen, H. W.; Baptista, A.; Drabløs, F.; Martel, P.; Petersen, S. B.; Sebastião, M.; Vaz, L., Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. In *Biotechnology annual review*, Elsevier: 1995; Vol. 1, pp 315-371.
69. Verger, R., 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **1997**, *15* (1), 32-38.
70. Brady, L.; Brzozowski, A. M.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, G.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Høge-Jensen, B.; Nørskov, L., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **1990**, *343* (6260), 767-770.
71. SCHRAG, J.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M., Nature (London), 351,761-764. *SERC Daresbury Laboratory (1979). CCP4. A Suite of Programs for Protein Crystallography. SERC Daresbury Laboratory, Warrington WA4 4AD, England. WINKLER, FK, D'ARCY, A. & HUNZIKER, W.(1990). Nature (London) 1991, 343, 771-774.*
72. Brzozowski, A.; Derewenda, U.; Derewenda, Z.; Dodson, G.; Lawson, D.; Turkenburg, J.; Bjorkling, F.; Høge-Jensen, B.; Patkar, S.; Thim, L., A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **1991**, *351* (6326), 491-494.
73. Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R., Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of molecular biology* **1984**, *179* (1), 125-142.
74. Marañón, A.; Hoyos, P.; Carballeira, J. D.; Cabrera, Á. C.; Ansorge-Schumacher, M. B.; Alcántara, A. R., Lipase from *Pseudomonas stutzeri*: purification, homology modelling and rational explanation of the substrate binding mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *87*, 88-98.
75. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, *2* (4), 293-308.
76. Martinelle, M.; Holmquist, M.; Hult, K., On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1995**, *1258* (3), 272-276.
77. Adlercreutz, P., Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (15), 6406-6436.
78. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A., A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase



from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56* (8), 2656-2665.

79. Bordes, F.; Cambon, E.; Dossat-Létisse, V.; Andre, I.; Croux, C.; Nicaud, J.; Marty, A., Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *Chembiochem* **2009**, *10* (10), 1705-1713.

80. Pleiss, J.; Scheib, H.; Schmid, R. D., The His gap motif in microbial lipases: a determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* **2000**, *82* (11), 1043-1052.

81. Jones, J. B.; Beck, J. F., Asymmetric syntheses and resolutions using enzymes. *Applications of biochemical systems in organic chemistry* **1976**, *1*.

82. Devaux-Basseguy, R.; Bergel, A.; Comtat, M., Potential applications of NAD (P)-dependent oxidoreductases in synthesis: a survey. *Enzyme and microbial technology* **1997**, *20* (4), 248-258.

83. Schubert, T.; Hummel, W.; Kula, M. R.; Müller, M., Enantioselective synthesis of both enantiomers of various propargylic alcohols by use of two oxidoreductases. *European Journal of Organic Chemistry* **2001**, *2001* (22), 4181-4187.

84. Hummel, W., New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In *New enzymes for organic synthesis*, Springer: 1997; pp 145-184.

85. Paul, C. E.; Hollmann, F., A survey of synthetic nicotinamide cofactors in enzymatic processes. *Applied microbiology and biotechnology* **2016**, *100* (11), 4773-4778.

86. De Smidt, O.; Du Preez, J. C.; Albertyn, J., The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS yeast research* **2008**, *8* (7), 967-978.

87. Hernández-Tobías, A.; Julián-Sánchez, A.; Piña, E.; Riveros-Rosas, H., Natural alcohol exposure: is ethanol the main substrate for alcohol dehydrogenases in animals? *Chemico-biological interactions* **2011**, *191* (1-3), 14-25.

88. Sund, H.; Theorell, H., Alcohol Dehydrogenases, Vol. 7. Academic Press, London: 1963.

89. Park, D.-H.; Plapp, B., Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (20), 13296-13302.

90. Eklund, H.; Nordström, B.; Zeppezauer, E.; Söderlund, G.; Ohlsson, I.; Boiwe, T.; Söderberg, B.-O.; Tapia, O.; Brändén, C.-I.; Åkeson, Å., Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *Journal of molecular biology* **1976**, *102* (1), 27-59.

91. Cedergren-Zeppezauer, E.; Andersson, I.; Ottonello, S.; Bignetti, E., X-ray analysis of structural changes induced by reduced nicotinamide adenine dinucleotide when bound to cysteine-46-carboxymethylated liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **1985**, *24* (15), 4000-4010.

92. Brändén, C.-I.; Jürnvall, H.; Eklund, H.; Furugren, B., 3 Alcohol dehydrogenases. In *The enzymes*, Elsevier: 1975; Vol. 11, pp 103-190.

93. Brandt, E. G.; Hellgren, M.; Brinck, T.; Bergman, T.; Edholm, O., Molecular dynamics study of zinc binding to cysteines in a peptide mimic of the alcohol dehydrogenase structural zinc site. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11* (6), 975-983.

94. Eklund, H.; Ramaswamy, S., Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and molecular life sciences* **2008**, *65* (24), 3907.
95. Esposito, L.; Bruno, I.; Sica, F.; Raia, C. A.; Giordano, A.; Rossi, M.; Mazzarella, L.; Zagari, A., Crystal structure of a ternary complex of the alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* **2003**, *42* (49), 14397-14407.
96. Rubach, J. K.; Plapp, B. V., Amino acid residues in the nicotinamide binding site contribute to catalysis by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **2003**, *42* (10), 2907-2915.
97. Brändén, C. I.; Eklund, H. In *Coenzyme-induced conformational changes and substrate binding in liver alcohol dehydrogenase*, Ciba Found Symp, Wiley Online Library: 1978; pp 63-80.
98. Agarwal, P. K.; Webb, S. P.; Hammes-Schiffer, S., Computational studies of the mechanism for proton and hydride transfer in liver alcohol dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122* (19), 4803-4812.
99. Meijers, R.; Morris, R. J.; Adolph, H. W.; Merli, A.; Lamzin, V. S.; Cedergren-Zeppezauer, E. S., On the enzymatic activation of NADH. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (12), 9316-9321.
100. Ryde, U., On the role of Glu-68 in alcohol dehydrogenase. *Protein Science* **1995**, *4* (6), 1124-1132.
101. Sanghani, P. C.; Robinson, H.; Bosron, W. F.; Hurley, T. D., Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **2002**, *41* (35), 10778-10786.
102. Dołęga, A., Alcohol dehydrogenase and its simple inorganic models. *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254* (7-8), 916-937.
103. Bahnson, B. J.; Colby, T. D.; Chin, J. K.; Goldstein, B. M.; Klinman, J. P., A link between protein structure and enzyme catalyzed hydrogen tunneling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94* (24), 12797-12802.
104. Nagel, Z. D.; Klinman, J. P., Tunneling and dynamics in enzymatic hydride transfer. *Chemical reviews* **2006**, *106* (8), 3095-3118.
105. Olukoshi, E. R.; Packter, N. M., Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* **1994**, *140* (4), 931-943.
106. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V. T., The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry* **1999**, *29* (2), 119-131.
107. Vakhlu, J., Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology* **2006**, *9* (1), 0-0.
108. Wagner, A.; Daum, G., Formation and mobilization of neutral lipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Portland Press Ltd.: 2005.
109. Benjamin, S.; Pandey, A., *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* **1998**, *14* (12), 1069-1087.

110. Adlercreutz, P.; Gitlesen, T.; Ncube, I.; Read, J. S., [12] Vernonia lipase: A plant lipase with strong fatty acid selectivity. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 1997; Vol. 284, pp 220-232.
111. Tsuchiya, T.; Ohta, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Shimada, H.; Masuda, T.; Takamiya, K.-i., Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96 (26), 15362-15367.
112. Stintzi, A.; Heitz, T.; Prasad, V.; Wiedemann-Merdinoglu, S.; Kauffmann, S.; Geoffroy, P.; Legrand, M.; Fritig, B., Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **1993**, 75 (8), 687-706.
113. Crow, J. P.; Beckman, J. S.; McCord, J. M., Sensitivity of the essential zinc-thiolate moiety of yeast alcohol dehydrogenase to hypochlorite and peroxyxynitrite. *Biochemistry* **1995**, 34 (11), 3544-3552.
114. Korkhin, Y.; Kalb, A. J.; Peretz, M.; Bogin, O.; Burstein, Y.; Frolow, F., NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of *Clostridium beijerinckii* and *Thermoanaerobacter brockii*. *Journal of molecular biology* **1998**, 278 (5), 967-981.
115. MUHEIM, A.; WALDNER, R.; SANGLARD, D.; REISER, J.; SCHOEMAKER, H. E.; LEISOLA, M. S., Purification and properties of an aryl-alcohol dehydrogenase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *European journal of biochemistry* **1991**, 195 (2), 369-375.
116. Hitzeroth, H.; Klose, J.; Ohno, S.; Wolf, U., Asynchronous activation of parental alleles at the tissue-specific gene loci observed on hybrid trout during early development. *Biochemical genetics* **1968**, 1 (3), 287-300.
117. Tsukiji, S.; Pattnaik, S. B.; Suga, H., An alcohol dehydrogenase ribozyme. *Nature Structural & Molecular Biology* **2003**, 10 (9), 713-717.
118. McGee, H., *On food and cooking: the science and lore of the kitchen*. Simon and Schuster: 2007.
119. Christen, P.; Angeles, N.; Corzo, G.; Farres, A.; Revah, S., Microbial lipase production on a polymeric resin. *Biotechnology techniques* **1995**, 9 (8), 597-600.
120. Coenen, T.; Aughton, P.; Verhagen, H., Safety evaluation of lipase derived from *Rhizopus oryzae*: Summary of toxicological data. *Food and chemical toxicology* **1997**, 35 (3-4), 315-322.
121. Talon, R.; Montel, M.-C.; Berdague, J.-L., Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and microbial technology* **1996**, 19 (8), 620-622.
122. Kamini, N.; Mala, J.; Puvanakrishnan, R., Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *process Biochemistry* **1998**, 33 (5), 505-511.
123. Aravindan, R.; Anbumathi, P.; Viruthagiri, T., Lipase applications in food industry. **2007**.

124. Akita, H.; Chen, C. Y.; Uchida, K., A formal total synthesis of nikkomycin B based on enzymatic resolution of a primary alcohol possessing two stereogenic centers. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6 (9), 2131-2134.
125. Yokomatsu, T.; Nakabayashi, N.; Matsumoto, K.; Shibuya, S., Lipase-catalyzed kinetic resolution of cis-1-diethylphosphonomethyl-2-hydroxymethylcyclohexane. Application to enantioselective synthesis of 1-diethylphosphonomethyl-2-(5'-hydantoinyl) cyclohexane. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6 (12), 3055-3062.
126. Fernandez, S.; Ferrero, b. M.; Gotor, V.; Okamura, W. H., Selective acylation of A-Ring precursors of vitamin D using enzymes in organic solvents. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60 (19), 6057-6061.
127. Milton, J.; Brand, S.; Jones, M. F.; Rayner, C. M., Enantioselective enzymatic synthesis of the anti-viral agent lamivudine (3TC™). *Tetrahedron letters* **1995**, 36 (38), 6961-6964.
128. Goto, M.; Noda, S.; Kamiya, N.; Nakashio, F., Enzymatic resolution of racemic ibuprofen by surfactant-coated lipases in organic media. *Biotechnology letters* **1996**, 18 (7), 839-844.
129. Reddy, D., In-Industrial Biotechnology (Malik, VS and Sridhar, P., eds.). Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi: 1992.
130. Spener, F.; Schoemaker, M.; Feldbruegge, R.; Siegmann, C. In *Sensing lipids and lipid binding proteins*, DECHEMA BIOTECHNOLOGY CONFERENCES, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT: 1992; pp 507-507.
131. Kartal, F.; Kilinç, A.; Timur, S., Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* **2007**, 87 (10-11), 715-722.
132. Verma, N.; Thakur, S.; Bhatt, A., Microbial lipases: industrial applications and properties (a review). *Int Res J Biol Sci* **2012**, 1 (8), 88-92.
133. Grant, W.; Mwatha, W.; Jones, B., Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **1990**, 6 (2-3), 255-269.
134. Macrae, A.; Hammond, R., Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **1985**, 3 (1), 193-218.
135. Spiess, E., Raw materials. In *Chemistry and technology of the cosmetics and toiletries industry*, Springer: 1992; pp 1-35.
136. Marin, M.; Pedregosa, A.; Rios, S.; Ortiz, M. L.; Laborda, F., Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. *International biodeterioration & biodegradation* **1995**, 35 (1-3), 269-285.
137. Bednarski, W.; Adamczak, M.; Kowalewska-Piontas, J.; Zadernowski, R., Biotechnological methods for the up-grading and modification of animal waste fats. *Acta biotechnologica* **1994**, 14 (4), 387-393.

138. Giacomini, D.; Galletti, P.; Quintavalla, A.; Gucciardo, G.; Paradisi, F., Highly efficient asymmetric reduction of arylpropionic aldehydes by horse liver alcohol dehydrogenase through dynamic kinetic resolution. *Chemical Communications* **2007**, (39), 4038-4040.
139. Lüdeke, S.; Richter, M.; Müller, M., Stereoselective Synthesis of Three Isomers of tert-Butyl 5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexanoate through Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, 351 (1-2), 253-259.
140. Elleuche, S.; Fodor, K.; Klippel, B.; von der Heyde, A.; Wilmanns, M.; Antranikian, G., Structural and biochemical characterisation of a NAD<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase from *Oenococcus oeni* as a new model molecule for industrial biotechnology applications. *Applied microbiology and biotechnology* **2013**, 97 (20), 8963-8975.
141. Matsuyama, A.; Yamamoto, H.; Kawada, N.; Kobayashi, Y., Industrial production of (R)-1, 3-butanediol by new biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, 11 (4-6), 513-521.
142. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **2009**, 30 (16), 2785-2791.
143. Lam, P. Y.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M.; Combs, A., New aryl/heteroaryl C–N bond cross-coupling reactions via arylboronic acid/cupric acetate arylation. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (19), 2941-2944.
144. Chan, D. M.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P., New N-and O-arylations with phenylboronic acids and cupric acetate. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (19), 2933-2936.
145. Evans, D. A.; Katz, J. L.; West, T. R., Synthesis of diaryl ethers through the copper-promoted arylation of phenols with arylboronic acids. An expedient synthesis of thyroxine. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39 (19), 2937-2940.
146. Lam, P. Y., Chan–Lam Coupling Reaction: Copper-promoted C–Element Bond Oxidative Coupling Reaction with Boronic Acids. *Synthetic methods in drug discovery* **2016**, 1, 242-273.
147. Huffman, L. M.; Stahl, S. S., Carbon– nitrogen bond formation involving well-defined aryl–copper (III) complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (29), 9196-9197.

# CAPÍTULO 2

## *Objetivos*

*...que quiso hacer un montón de cosas...*

## 2. Objetivos

Considerando los múltiples aspectos de la síntesis orgánica descritos en el capítulo anterior, en este trabajo de tesis doctoral se aplicaron tanto técnicas de síntesis clásicas como biocatalíticas para la obtención de productos de interés.

En particular, se plantearon cuatro objetivos específicos que dan nombre a los capítulos siguientes de la tesis:

- Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir.
- Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico.
- Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH.
- Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria.

### **Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir**

Es ampliamente conocido que numerosas *N*-alquilamidas con un residuo alquílico son compuestos bioactivos. Entre ellas, los capsaicinoides son una familia de compuestos que poseen un residuo *N*-vainillilamida unido a una cadena de ácido graso, y difieren entre sí en la longitud, forma y número de insaturaciones de dicha cadena. Dichos capsaicinoides presentan numerosas propiedades interesantes, siendo por esta razón el objeto de numerosas investigaciones.<sup>1</sup>

Considerando ésto, decidimos desarrollar una metodología de síntesis enzimática de una serie de capsaicinoides para evaluarlos como antivirales. Además, con el objetivo de poder explicar de mejor manera los resultados experimentales obtenidos se propuso llevar adelante estudios computacionales de *docking*.

### **Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico**

Los ácidos biliares son esteroides que se encuentran abundantemente en la bilis de mamíferos y otros vertebrados.<sup>2</sup> Naturalmente participan de numerosos procesos metabólicos, pero además son actualmente evaluados y usados con diferentes objetivos farmacológicos, no sólo como principio activo sino también como parte de la formulación de drogas. En general, los usos de este tipo de compuestos están relacionados con su anfifilia.<sup>3</sup>

En particular, el ácido hiodesoxicólico es un ácido biliar sobre el cual se ha trabajado muy poco en comparación con el resto, por lo que nos propusimos analizar el comportamiento de este sustrato en reacciones catalizadas por lipasas y además obtener una serie de derivados que podrían tener aplicaciones útiles. Adicionalmente, para comprender mejor el comportamiento de este ácido biliar en las reacciones enzimáticas llevadas a cabo, se realizaron simulaciones de *docking*.

### **Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH**

La aplicación de alcohol deshidrogenasas para la síntesis de alcoholes, utilizando un sistema de regeneración del cofactor, representa un método eficiente y sostenible para la obtención de estos compuestos de gran interés.<sup>4</sup> Por otro lado, las reacciones biocatalíticas en solventes no convencionales, particularmente DES, han demostrado ser una excelente herramienta para resolver los desafíos que propone la química moderna.<sup>5</sup>

Considerando trabajos recientes que utilizan DES como medio en procesos biocatalíticos redox, y la capacidad de HLADH de aceptar dioles para dar lactonas inertes como producto,<sup>6</sup> se propuso como objetivo desarrollar un sistema biocatalítico para la obtención de alcoholes en DES, en el cual uno de los componentes del solvente actúe como parte del sistema de regeneración del cofactor, desplazando a la vez el equilibrio de la reacción al formar una lactona. De esta manera, al usar al solvente como parte de la reacción, se evita agregar otros agentes al medio haciendo el proceso mucho más simple y sostenible.

### **Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria**

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis se encuentran entre las enfermedades parasitarias más extendidas a nivel mundial, siendo los tratamientos existentes aún insatisfactorios.<sup>7</sup> Por esta razón, es menester desarrollar nuevas drogas que sean seguras, económicas y potentes.

Por otro lado, los derivados de quinolinas, generalmente utilizados como antimaláricos, han presentado actividad frente a los parásitos causantes de las enfermedades anteriormente mencionadas.<sup>8</sup> En este marco, decidimos embarcarnos en la síntesis de una serie de derivados de 2-, 3- y 6-aminoquinolina, así como también de 2-hidroxiquinolina para, en colaboración con otro grupo de trabajo, evaluar biológicamente varios de ellos frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*.



## **Bibliografía**

1. Rios, M. Y.; Olivo, H. F., Natural and synthetic alkaloids: applications in pain therapy. In *Studies in natural products chemistry*, Elsevier: 2014; Vol. 43, pp 79-121.
2. Setchell, K. D.; Kritchevsky, D.; Nair, P. P., *The bile acids: chemistry, physiology, and metabolism: volume 4: methods and applications*. Springer Science & Business Media: 2012.
3. Hassan, N.; Ahad, A.; Ali, M.; Ali, J., Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2010**, 7 (1), 97-112.
4. Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Current opinion in chemical biology* **2010**, 14 (2), 122-129.
5. Pätzold, M.; Siebenhaller, S.; Kara, S.; Liese, A.; Syldatk, C.; Holtmann, D., Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends in biotechnology* **2019**.
6. Irwin, A. J.; Jones, J. B., Asymmetric syntheses via enantiotopically selective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of diols containing a prochiral center. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, 99 (2), 556-561.
7. Urbina, J. A., Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica* **2010**, 115 (1-2), 55-68.
8. Lechuga, G. C.; Borges, J. C.; Calvet, C. M.; de Araújo, H. P.; Zuma, A. A.; do Nascimento, S. B.; Motta, M. C. M.; Bernardino, A. M. R.; de Souza Pereira, M. C.; Bourguignon, S. C., Interactions between 4-aminoquinoline and heme: promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2016**, 6 (3), 154-164.

# CAPÍTULO 3

## ***Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir***

...¡Y algunas le salieron!

### **3. Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir**

#### **3.1. Introducción**

Las *N*-alquilamidas son alcaloides bioactivos con probada actividad insecticida,<sup>1, 2</sup> antimalárica,<sup>3, 4</sup> antibacteriana,<sup>5</sup> antiinflamatoria<sup>6</sup> y antioxidante,<sup>7</sup> entre muchas otras.<sup>8</sup> Todo esto hace que las *N*-alquilamidas sean productos de una gran importancia farmacológica. Se sabe que éstas tienen una gran diversidad estructural y producen los efectos biológicos antes mencionados mediante múltiples mecanismos de acción, por lo que se han realizado numerosos estudios en un intento de sistematizar la información disponible acerca de su química, funcionalidad y distribución en la naturaleza.<sup>9</sup>

Es así que se han aislado más de 300 *N*-alquilamidas como productos naturales. Las fuentes más comunes de estos alcaloides son las plantas pertenecientes a las familias Asteraceae, Solanaceae, Rutaceae y Piperaceae, aunque su presencia ha sido confirmada en por lo menos otras 35 familias de plantas.<sup>10</sup>

Entre la gran variedad de *N*-alquilamidas naturales conocidas se destacan los capsaicinoides, que son característicos de las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae, en particular, aquellas del género *Capsicum*. Son los metabolitos responsables del aroma, el color, la acidez y la sensación pungente que se tiene al morder los frutos conocidos como ajíes picantes o “chili”,<sup>11</sup> mostrados en la figura 3.1. Estos frutos, o sus productos derivados, son consumidos en cantidades variables en todo el mundo, llegando a ser parte fundamental de la cultura popular en países como México, India, Brasil, Tailandia, China o Malasia. Actualmente se conocen unas 20 especies salvajes y cinco cultivadas de “chili”, incluyendo pimientos picantes y dulces, ambos con un gran valor económico. Los capsaicinoides se encuentran principalmente en el pericarpio de dichos frutos, alojados en vesículas.



**Figura 3.1.** *Ají rojo de Cayena (A). A pesar de compartir el nombre, los Red Hot Chili Peppers (B) no pertenecen a plantas del género Capsicum.*

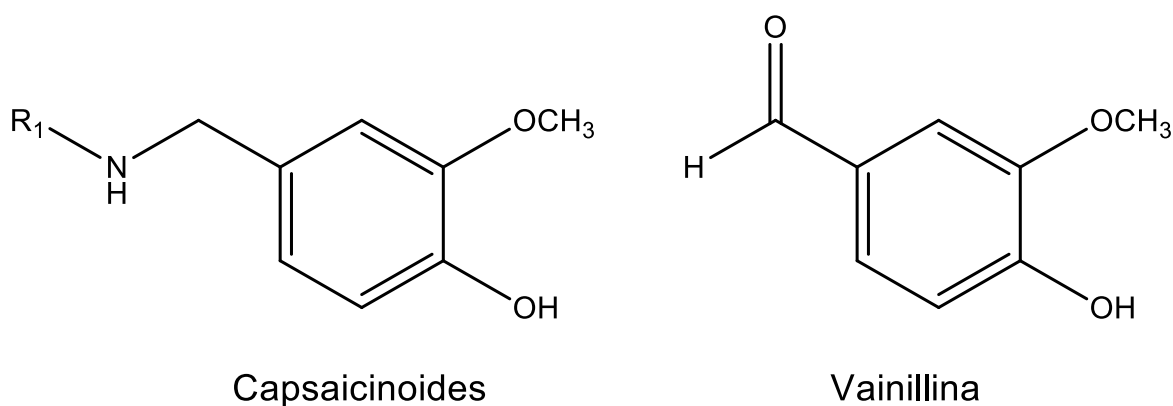
Como medida de la pungencia de los pimientos, tradicionalmente se utiliza la escala de Scoville, que se basa en la concentración de capsaicinoides, principalmente capsaicina. Dicha escala lleva el nombre de su creador, Wilbur Scoville, quien desarrolló un método organoléptico en 1912 para determinar la pungencia. Dicho método consistía en suspender una cantidad determinada de pimiento seco en alcohol etílico para extraer los capsaicinoides. Luego se disolvían distintas cantidades de este extracto en agua con azúcar y se le daba a probar a un panel de cinco personas hasta que la mayoría ya no podía percibir el picante.<sup>12</sup> En términos de unidades Scoville (SHU), el número de unidades de un dado fruto es igual al número de veces que un extracto del pimiento debe ser diluido para que la pungencia sea imperceptible.<sup>13</sup> Por supuesto, este método está sujeto a la subjetividad de las personas que prueban las diluciones, que a su vez depende no sólo del paladar de cada uno sino también del número de receptores que posean para el picante, lo cual varía notablemente de persona a persona.<sup>14</sup> Otro problema es la desensibilización producida tras probar varias muestras en un período corto de tiempo.<sup>15</sup> Todo esto provoca que los resultados al aplicar este método varíen hasta en un 50%.<sup>16</sup> Por todas estas razones, actualmente se prefiere la utilización de métodos como la cromatografía líquida de alta resolución, que permite establecer con mayor precisión la pungencia midiendo la concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina. A la vez, se asume que toda la pungencia proviene de estos dos capsaicinoides.<sup>16</sup> Usando este método los resultados se informan como partes por millón de picante (ppmH), un valor que se obtiene mediante la ecuación 3.1.

$$ppmH = \frac{\text{área capsaicina} + 0,82 \cdot \text{área dihidrocapsaicina}}{\text{área patrón}} \quad (\text{ec. 3.1.})$$

El valor obtenido luego puede transformarse en SHU, que es la escala más ampliamente usada en la industria, multiplicándolo por un factor de 16.<sup>17</sup>

Por ejemplo, el gas pimienta utilizado para defensa personal tiene un valor de entre 1.500.000 y 3.000.000 SHU; el rocoto, muy utilizado en la gastronomía andina latinoamericana, se encuentra en el rango de 100.000 y 350.000 SHU (¡diez veces menos!), y el pimiento común o pimiento dulce al no tener capsaicina tiene un valor de cero SHU o cercano a cero.

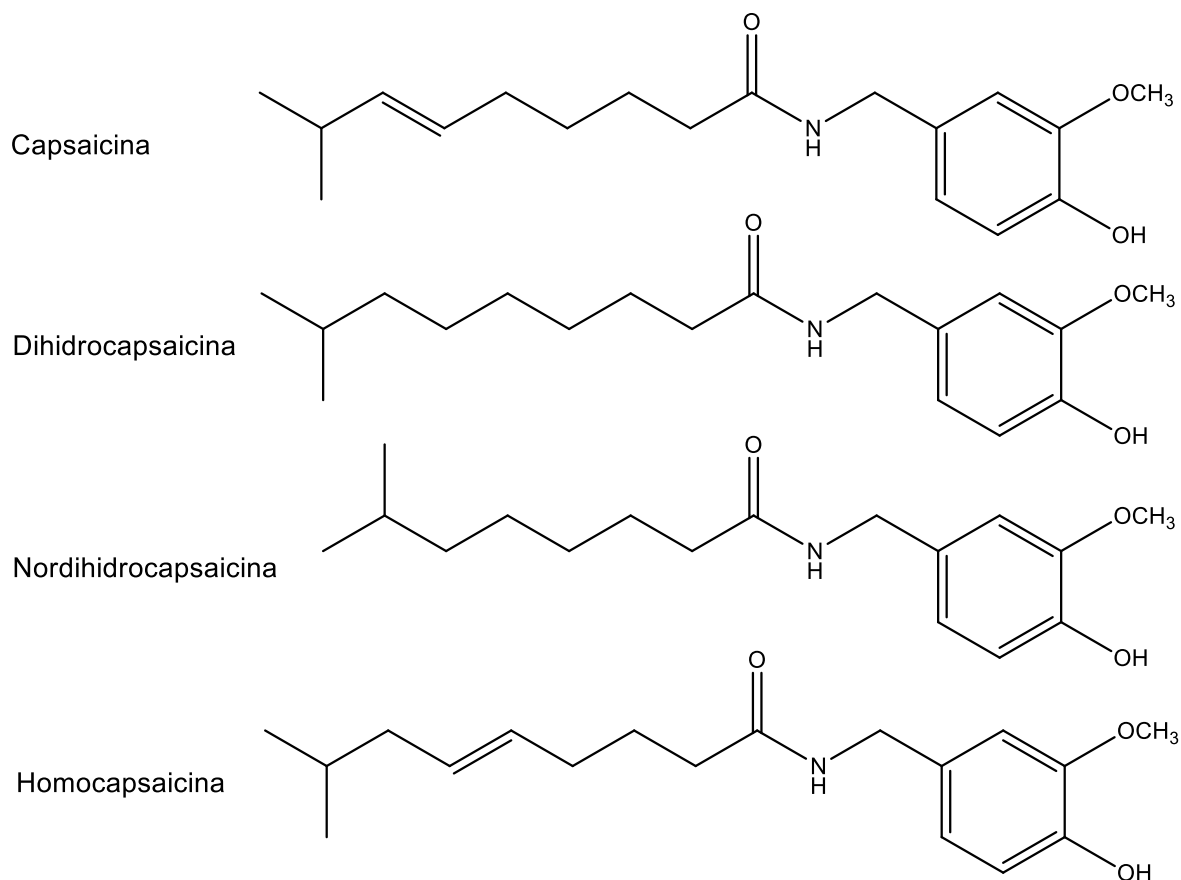
Todos los capsaicinoides poseen una característica estructural en común, detallada en la figura 3.2, que es un anillo aromático sustituido con un metoxilo y un hidroxilo. Debido a la similitud estructural con la vainillina, se suele denominar a los capsaicinoides como vainilloides o *N*-acilvainillilaminas (NVAs).



**Figura 3.2.** Similitudes estructurales entre los capsaicinoides y el compuesto natural vainillina.

*R*<sub>1</sub>=Acilo.

La pungencia, quemazón y sensación picante son causadas en humanos debido a la interacción de los capsaicinoides con los receptores TRP presentes en la boca, la piel y las mucosas. Es esta misma interacción la que es responsable de los efectos analgésicos y anestésicos que presentan los capsaicinoides.<sup>18</sup> Es interesante destacar que hay una relación marcada entre la pungencia y el largo de cadena alquílica, observándose un máximo cuando la cadena posee nueve átomos de carbono (como es el caso de la capsaicina o la dihidrocapsaicina).<sup>19</sup> Cuando la cadena alquílica gana o pierde un carbono se observa una pérdida de aproximadamente la mitad de la pungencia, como es el caso de la nordihidrocapsaicina, la homocapsaicina o la homodihidrocapsaicina (Figura 3.3).<sup>20</sup> Cadenas más largas que 18 carbonos ya no presentan pungencia,<sup>21</sup> lo que hace que estos compuestos sean muy interesantes para desarrollar tratamientos tópicos novedosos sin los efectos colaterales no deseados, tales como la irritación.



**Figura 3.3.** Estructura de cuatro capsaicinoides.

Considerando el gran potencial de los capsaicinoides para fines farmacológicos, y la dificultad para alcanzar una buena quimioselectividad en su acilación, decidimos enfocarnos en la síntesis de diferentes *N*-acilvainillilaminas aplicando dos estrategias biocatalíticas distintas, una *one-pot*, y otra *one-pot two-steps*, detalladas en la figura 3.4. Así fue que logramos obtener una serie de once derivados que, en colaboración con el grupo de la Dra. Alché, se evaluaron como antivirales en cepas de herpes simple tipo 1 (VHS-1). Por otro lado, se observó que la velocidad de reacción se veía afectada por el largo de cadena, por lo que se llevaron adelante estudios de cromatografía y simulaciones computacionales para explicar dicho efecto.

### 3.2. Resultados y discusión

Hasta ahora, los métodos clásicos de síntesis de capsaicinoides tienen un éxito limitado.<sup>22</sup> Esto se debe, entre otros factores, a la toxicidad de los reactivos que deben ser empleados, a la formación de productos secundarios que afectan notablemente el rendimiento final y a procesos tediosos de

protección y desprotección de los grupos presentes en el anillo aromático. Como consecuencia, la utilización de enzimas para obtener derivados de capsaicinas es una opción cada vez más interesante.

En trabajos anteriores en los que se aplicaron métodos tradicionales de síntesis, se obtuvo una serie de NVAs a partir de acilación de vainillilamina (VA) utilizando anhídridos fosfóricos.<sup>23</sup> También se registra la síntesis de NVAs utilizando lipasas, aunque obteniendo rendimientos muy bajos y tiempos de reacción sumamente largos,<sup>24-26</sup> así como la síntesis de olvanil (vainilliloleamida) usando lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) en solventes orgánicos.<sup>27</sup>

Teniendo en cuenta estos trabajos buscamos mejorar el rendimiento en la obtención de derivados de vainillilamida optimizando nuestra propia estrategia de síntesis, así como el proceso de purificación de los productos.

Para lograrlo, planteamos un proceso enzimático a partir de vainillilamina y una serie variada de ácidos grasos: cortos, medios y largos, saturados e insaturados, *Z* y *E*.

La estrategia de síntesis se enfocó mediante dos procedimientos diferentes. El primero consistiendo en dos pasos: la reacción del ácido graso con etanol para obtener el éster etílico correspondiente, seguido de la acilación de la VA con dicho éster. El segundo enfoque consistió en la acilación directa de VA con el correspondiente ácido graso.

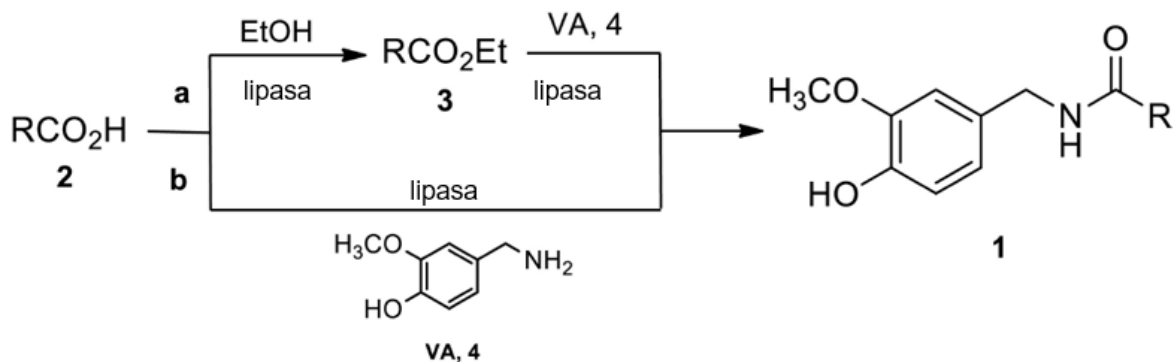
Con el objetivo de obtener las condiciones óptimas, se estudió el comportamiento de varias lipasas, así como diferentes parámetros de reacción tales como el tipo de solvente a utilizar, temperatura, relación enzima/sustrato (E/S) y relación agente acilante/sustrato (A/S). En todos los casos tomamos al ácido esteárico (**2f**) o al estearato de etilo (**3**) como agente acilante modelo. Una vez obtenidas dichas condiciones, éstas se extrapolaron a la síntesis del resto de los derivados.

### 3.3. Selección de la enzima y efecto del solvente

Se evaluaron cinco lipasas de diferentes fuentes: de las levaduras *Candida rugosa* (CRL) y *Candida antarctica* B (CAL B); lipozima de los hongos *Rhizomucor miehei* (RMIM) y de *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) y también de origen vegetal: la lipasa de *Carica papaya* (CPL), obtenida como la fracción sólida del látex de papaya después de eliminar las proteasas mediante lavado.

A pesar de que se han hecho numerosos estudios acerca del efecto de los solventes orgánicos en reacciones catalizadas por lipasas,<sup>28</sup> éste sigue siendo difícil de predecir. Por lo tanto, la manera práctica de elegir el mejor solvente para llevar adelante una reacción es ensayar varios, en lo que se conoce como experimentos de *screening*. En este trabajo se evaluaron cuatro solventes distintos: hexano, diisopropil éter (DIPE), tolueno y acetona. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas

halladas para transformaciones similares, las reacciones se realizaron a 55 °C utilizando una relación E/S igual a 10, y una relación A/S igual a 1,2. En aquellos casos en que se utilizó estearato de etilo (3), éste se preparó a partir de ácido esteárico y etanol según condiciones desarrolladas anteriormente en nuestro laboratorio,<sup>29</sup> utilizando CAL B como biocatalizador en una relación E/S igual a 1, hexano como solvente, una temperatura de 55 °C y una relación de etanol/ácido graso igual a 1,2.



**Figura 3.4.** Esquema de las estrategias de síntesis aplicadas (a y b) para la obtención de N-acilvainillilamidas.

Se observó formación de producto tanto con CAL B, TLIM y RMIM, mientras que CRL y CPL fueron inactivas tanto con ácido esteárico como con estearato de etilo. La conversión se determinó a las 24 hs de reacción. Con respecto a las dos estrategias de síntesis planteadas notamos que, aunque la conversión al utilizar **2f** o **3** no es significativamente distinta, con el primero la reacción es más sencilla ya que no es necesario realizar el paso de esterificación. Este resultado no fue completamente inesperado ya que, aunque al aplicar estrategias de síntesis tradicional los ésteres suelen dar mejores resultados para este tipo de reacciones, en ocasiones anteriores en el laboratorio ya habíamos obtenido excelentes conversiones utilizando directamente ácidos carboxílicos.<sup>29</sup> Por ende, decidimos llevar adelante las reacciones directamente con el ácido.

Así, concluimos que los resultados más satisfactorios fueron los obtenidos con TLIM utilizando ácido esteárico como agente acilante en DIPE, tal como se observa en la tabla 3.1., entrada 6.



**Tabla 3.1.** Screening para optimizar tipo de lipasa y solvente a usar en la síntesis catalizada por lipasas de N-estearoilvainillilamina.

<b>Entrada</b>	<b>Lipasa</b>	<b>Solvente</b>	<b>Agente acilante</b>	<b>Conversión (%)</b>
1	CAL B	Hexano	2f	49
2	CAL B	DIPE	2f	78
3	CAL B	Tolueno	2f	0
4	CAL B	Acetona	2f	0
5	TLIM	Hexano	2f	73
6	TLIM	DIPE	2f	100
7	TLIM	Tolueno	2f	25
8	TLIM	Acetona	2f	0
9	RMIM	Hexano	2f	50
10	RMIM	DIPE	2f	89
11	RMIM	Tolueno	2f	20
12	RMIM	Acetona	2f	0
13	CAL B	Hexano	3	50
14	CAL B	DIPE	3	78
15	CAL B	Tolueno	3	0
16	CAL B	Acetona	3	0
17	TLIM	Hexano	3	70
18	TLIM	DIPE	3	98
19	TLIM	Tolueno	3	25
20	TLIM	Acetona	3	0
21	RMIM	Hexano	3	40
22	RMIM	DIPE	3	78

<b>23</b>	RMIM	Tolueno	3	20
<b>24</b>	RMIM	Acetona	3	0

Temperatura: 55 °C; tiempo 24 hs; E/S: 10, A/S: 1. Conversiones calculadas por HPLC según método descrito en el capítulo 7.

La misma enzima de *Thermomyces lanuginosus* también fue activa en hexano y tolueno, aunque en menor medida. En comparación, CAL B y RMIM tuvieron una menor eficiencia. En ausencia de biocatalizador no se observó formación de producto.

Una vez que se eligió el solvente y la lipasa adecuada, se estudió el tiempo necesario para que la reacción alcance el 100% de conversión, observándose que éste es de 3 horas.

### **3.4. Efecto de la relación enzima:sustrato**

Se evaluó la influencia de la relación E/S en la acilación enzimática usando una relación A/S igual a 1,2, como solvente se utilizó DIPE a una temperatura de 55 °C y cantidades variables de TLIM. Tras analizar los resultados obtenidos se observó que una relación E/S igual a 1 daba los mejores resultados, como se observa en la tabla 3.2, entrada 4. Sin embargo, incluso cuando se trabajó con una relación E/S igual a 0,2 se obtuvo un 100% de conversión en un tiempo de 8 hs, lo cual es razonable para una biotransformación (Tabla 3.2, entrada 7). Estos resultados muestran la gran eficiencia de TLIM al ser aplicada en este proceso. Considerando todo lo anteriormente expuesto, así como factores económicos, decidimos que es preferible utilizar la cantidad más baja posible de enzima, eligiendo la relación E/S igual a 0,2.

### **3.5. Efecto de la relación agente acilante:sustrato**

La influencia de la relación A/S en el rendimiento de la acilación se evaluó en DIPE usando TLIM a 55 °C. En la tabla 3.2, entradas 9-12, se observa que una relación equimolar fue suficiente para alcanzar los mejores resultados.

**Tabla 3.2.** Optimización de los parámetros de reacción para la síntesis catalizada por lipasas de *N*-estearoilvainillilamina<sup>a</sup>.

Entrada	T (°C)	E/S <sup>b</sup>	A/S	t (h)	Conversión (%)
<b>E/S</b>					
1	55	10	1,2	3	100
2	55	5	1,2	3	100
3	55	2	1,2	3	100
4	55	1	1,2	3	100
5	55	0,5	1,2	3	97
6	55	0,2	1,2	3	89
7	55	0,2	1,2	8	100
8	55	0,1	1,2	8	78
<b>A/S</b>					
9	55	0,5	1,0	3	97
10	55	0,2	1,5	3	90
11	55	0,2	1,0	3	89
12	55	0,2	1,0	8	100
<b>Temperatura</b>					
13	25	0,5	1,0	18	100
14	<b>25</b>	<b>0,2</b>	<b>1,0</b>	<b>18</b>	<b>100</b>
15	40	0,2	1,0	12	100

<sup>a</sup>Condiciones de reacción: Enzima: TLIM; Solvente: DIPE. <sup>b</sup>E/S: relación expresada como mg enzima/mg de sustrato. Conversiones calculadas por HPLC según método descrito en el capítulo 7.

### 3.6. Influencia de la temperatura

Con el objetivo de investigar la influencia de la temperatura en la acilación enzimática en estudio, llevamos adelante la reacción a 25 °C, 40 °C y 55 °C, dejando todos los otros parámetros fijos en sus valores óptimos (TLIM, DIPE, E/S: 0,2 o 0,5 y A/S: 1,0). En la tabla 3.2, se puede observar que a temperatura ambiente también se obtiene la máxima conversión, aunque a mayores tiempos de reacción. Considerando que estos resultados son adecuados y que resulta más conveniente trabajar a temperatura ambiente, 25 °C fue elegida como la temperatura de reacción

### 3.7. Síntesis de derivados de vainillilamina

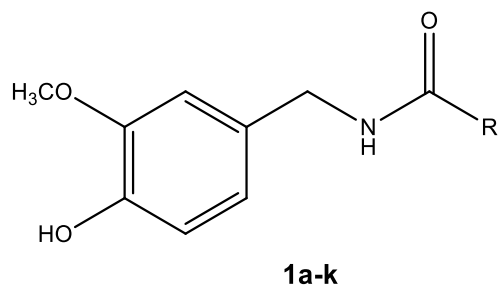
Considerando los resultados expuestos en las secciones anteriores, las condiciones elegidas para llevar adelante las diferentes acilaciones de vainillilamina son las detalladas en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Condiciones óptimas para la síntesis de N-estearoilvainillilamina.

Enzima	Solvente	T (°C)	Agente acilante	E/S	A/S
TLIM	DIPE	25	2f	0,2	1,0

Dichas condiciones se aplicaron a una variedad de ácidos grasos, dando lugar a la síntesis de los productos **1a-k**, tal como se observa en la figura 3.5.

Los resultados obtenidos luego de 24 horas en todas estas reacciones se encuentran detallados en la tabla 3.4. Al monitorear el progreso de cada una de estas reacciones se observó que la velocidad de reacción dependía del largo de cadena del ácido graso utilizado. En todos los casos el rendimiento obtenido fue excelente pero el tiempo para que la reacción concluyera variaba entre 18 y 24 horas. Las reacciones más rápidas fueron aquellas en las que el ácido graso tenía entre doce y dieciséis átomos de carbono, observándose que incluso habiendo transcurrido apenas tres horas, dichas reacciones mostraban una conversión prácticamente cuantitativa. Además, hemos comprobado que TLIM retenía el 75% de su actividad luego de cinco ciclos.



R: CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>-, n= 3 (**1a**), 6 (**1b**), 9 (**1c**), 11 (**1d**), 13 (**1e**), 15 (**1f**)  
 CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>-, *cis* (**1g**) y *trans* (**1h**)  
 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>(CH=CHCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>- (**1i**)  
 CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH (**1j**)  
 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>- (**1k**)

**Figura 3.5.** Estructura de las N-acilvainillilaminas obtenidas.

**Tabla 3.4.** Síntesis enzimática de N-acilvainillilaminas.

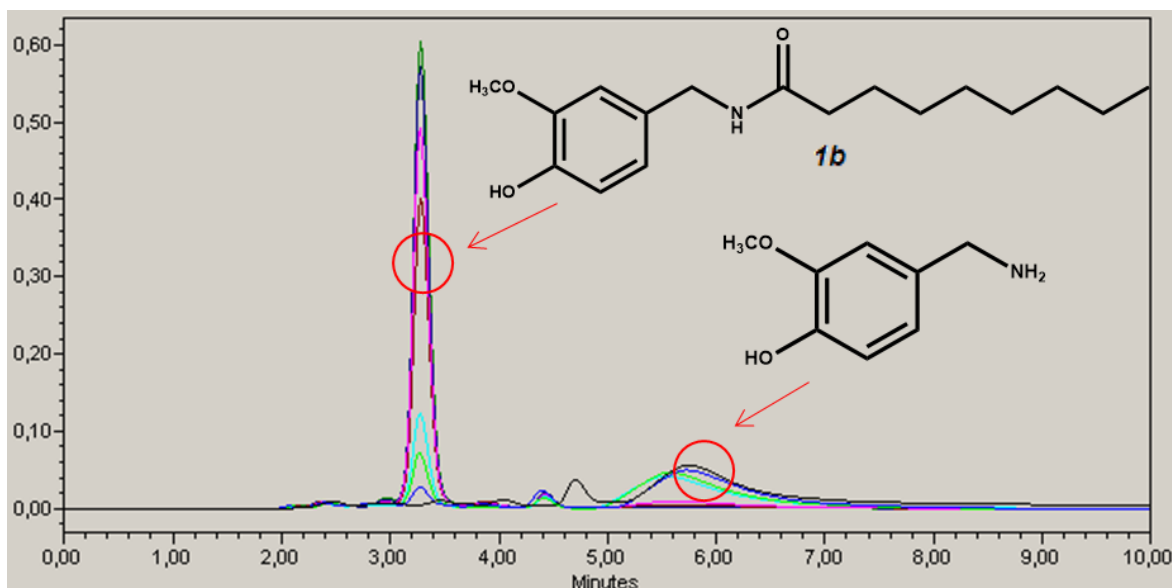
Entrada	Ácido graso	Producto	Rendimiento
1	Caproico	<b>1a</b>	90
2	Pelargónico	<b>1b</b>	92
3	Láurico	<b>1c</b>	99
4	Mirístico	<b>1d</b>	99
5	Palmítico	<b>1e</b>	99
6	Esteárico	<b>1f</b>	94
7	Oleico	<b>1g</b>	95
8	Elaidico	<b>1h</b>	95
9	Linoleico	<b>1i</b>	93
10	Linolénico	<b>1j</b>	93
11	Araquidónico	<b>1k</b>	92

Condiciones de reacción: Enzima TLIM; solvente: DIPE; temperatura: 25 °C; E/S: 0,2; A/S: 1,0; t: 24 hs. Rendimientos calculados tras la purificación pesando los productos.

Considerando los resultados experimentales detallados hasta el momento, decidimos llevar adelante un análisis más profundo de nuestro sistema para comprender mejor la influencia del ácido graso en la acilación de **4**. Para ello, tomamos alícuotas de todas las reacciones a tiempos diferentes y las analizamos mediante HPLC. Como ejemplo, en la figura 3.6 se muestran los cromatogramas superpuestos obtenidos a diferentes tiempos para la reacción de obtención de **1b**. Al hacer esto para cada derivado notamos una tendencia marcada, donde se observa una correlación entre la cantidad de producto formado a un dado tiempo y el largo de cadena del agente acilante, tal como se observa en la figura 3.7.A. Un ácido muy corto o muy largo requiere un mayor tiempo de reacción, mientras que las cadenas de largo intermedio reaccionan más velozmente, observándose un máximo para el ácido láurico. Adicionalmente se observó que ni la presencia ni el número de insaturaciones afectaban apreciablemente la velocidad de reacción.

### 3.8. Modelado molecular

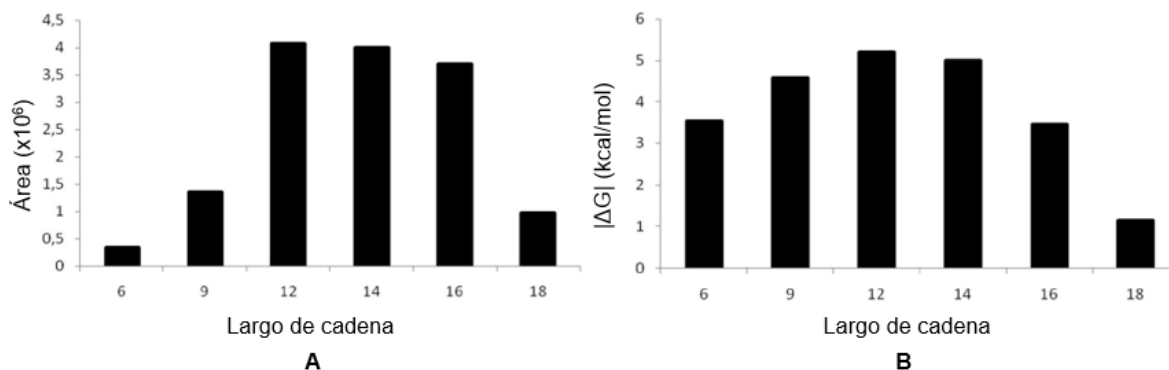
Con el objetivo de estudiar más profundamente la acilación enzimática de VA decidimos llevar adelante un estudio de modelado molecular. De esta manera, pudimos entender mejor la relación entre la estructura del sustrato y la velocidad de reacción. Se realizaron estudios sobre los ácidos **2 a-f**, utilizando TLIM como enzima y se evaluó cómo dichos ácidos se acomodaban en el bolsillo hidrofóbico de la enzima.



**Figura 3.6.** Cromatograma en el cual se aprecia la formación del producto **1b** y la desaparición de VA a medida que la reacción progresa.

Como se mencionó en el primer capítulo de esta tesis, todas las lipasas presentan un sitio activo constituido por una tríada catalítica conservada, formada por un residuo de Serina, Histidina y Aspartato o Glutamato. Estas enzimas también presentan un hueco oxianión formado por dos residuos capaces de formar enlaces de hidrógeno que estabilizan el intermediario tetraédrico formado durante la reacción, así como un bolsillo hidrofóbico, que es el sitio por el cual ingresan los sustratos. Dicho bolsillo hidrofóbico varía de tamaño según la lipasa, por lo que su tamaño es un parámetro importante que puede influir sobre la reactividad de la enzima.

El análisis de los resultados obtenidos llevó a la selección de la conformación más probable para cada ácido graso, considerando la interacción con los aminoácidos del sitio activo (Asp201-His258-Ser146), la energía de unión y la cantidad de *clusters* como criterio de selección. Se realizaron 200 evaluaciones de *docking* para cada sustrato, las cuales generaron 200 conformeros cada uno, hallados usando el algoritmo genético Lamarckiano para su búsqueda. Dado que las propiedades electrónicas de los sustratos son muy similares, consideramos probable que sus características estéricas influyan el resultado de las reacciones catalizadas por TLIM. En efecto, fue posible observar una correlación entre el largo de cadena de los ácidos grasos estudiados y la energía promedio de unión del intermediario y, según se observa comparando las figuras 3.7 A y B, dicha tendencia es similar a la obtenida empíricamente.

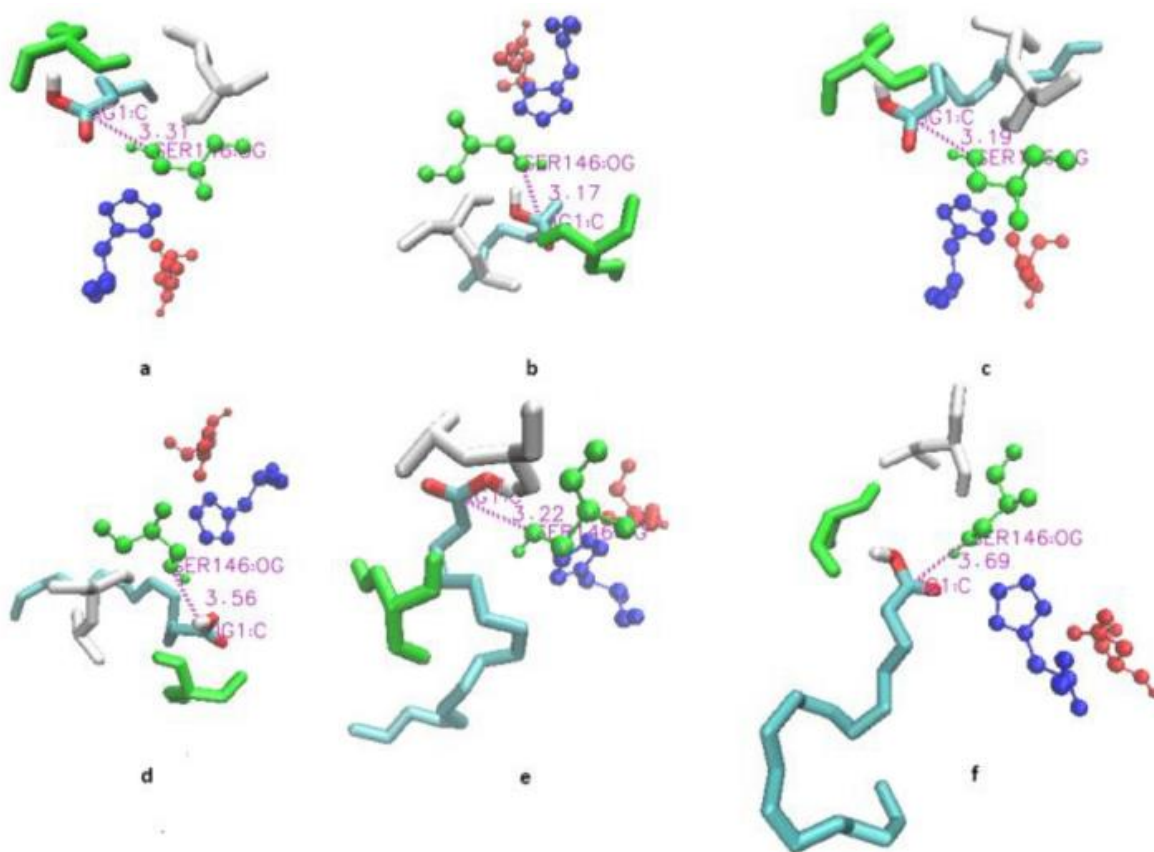


**Figura 3.7.** Comparación entre la tendencia obtenida empíricamente por HPLC (A) y la obtenida mediante estudios computacionales (B)

Estos resultados nos han permitido tener una idea más acabada de cómo es la interacción entre el catalizador y el agente acilante, dándonos información a un nivel molecular acerca de cómo se desarrolla la reacción. Se observó que los ácidos láurico y mirístico mostraron la menor energía promedio de unión con la menor distancia de interacción al sitio activo. Esto podría explicar por qué

dichos sustratos fueron los que reaccionaron más rápidamente de todos los ácidos en estudio. En la figura 3.8 se muestra una representación de los resultados del estudio de *docking* para seis ácidos grasos distintos.

Al analizar los histogramas obtenidos para cada sustrato en el que se relaciona el número de conformeros con la energía de unión, se observa que los *clusters* con menor energía de unión no siempre son los más probables, es decir los más poblados. Esto puede deberse a la falta de precisión en el cálculo de la energía de interacción entre el ligando y la enzima. El campo de fuerza utilizado por el programa estima la energía libre utilizando sólo una conformación del complejo enzima-ligando, de forma que no se tiene en cuenta la entropía conformacional del sistema. Diferentes estudios indican que los *clusters* más poblados son los que poseen una entropía favorable para la formación del complejo enzima-ligando. Por ende, las conformaciones adoptadas en dichos *clusters* coinciden con los modos de unión observados experimentalmente en la mayoría de los casos.<sup>30-33</sup>



**Figura 3.8.** Resultados del estudio de *docking* para TLIM utilizando (a) ácido caproico, (b) ácido pelargónico, (c) ácido láurico, (d) ácido mirístico, (e) ácido palmítico, (f) ácido esteárico. Distancias en Å.



### 3.9. Evaluación biológica

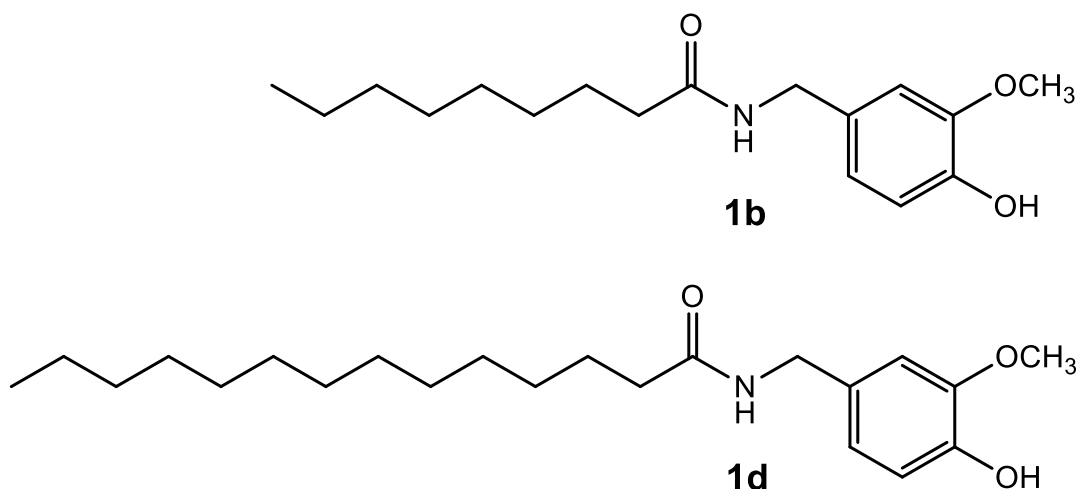
Considerando las numerosas aplicaciones que poseen los capsaicinoides y en particular varios antecedentes acerca de su uso como antivirales,<sup>34-36</sup> decidimos evaluar biológicamente los compuestos sintetizados en este trabajo. Ésto se realizó en el Laboratorio de Virología del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, en colaboración con la Lic. Nadia Boscaro y la Dra. Laura Alché.

El virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) es una de las infecciones virales más comunes a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se estima que alrededor del 67% de la población por debajo de 50 años la tiene, siendo especialmente prevalente en África y América (88 y 45% de la población respectivamente). Los síntomas suelen ser la formación de ampollas en los labios o la zona genital, aunque por lo general esta enfermedad es asintomática o presenta cuadros leves, y la mayoría de la gente desconoce ser portadora del virus. Luego de la infección inicial, y con un tratamiento adecuado, las manifestaciones del virus suelen desaparecer, aunque el virus permanece latente en el cuerpo y pueden presentarse brotes recurrentes.

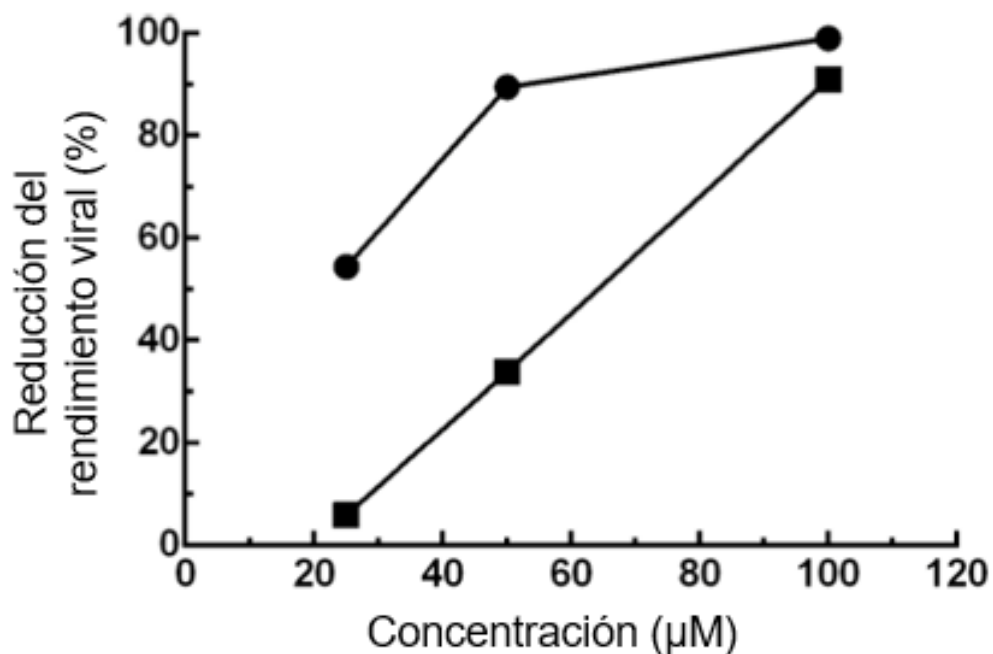
Actualmente, los antivirales más utilizados para tratar esta enfermedad son el Aciclovir, el Famciclovir y el Valaciclovir. Dichos fármacos logran reducir la severidad y frecuencia de los síntomas, aunque no pueden curar completamente la infección.

Por otro lado, en personas inmunocomprometidas, como aquellas con infecciones avanzadas de VIH, o con trasplantes de médula ósea, pueden presentarse síntomas severos y una alta tasa de recurrencia de los brotes, llegando incluso a tener complicaciones severas tales como infecciones cerebrales y/o oculares. Además, estos pacientes suelen presentar infecciones provocadas por cepas resistentes a los tratamientos tradicionales, por lo que es necesario aplicar estrategias distintas de tratamiento. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, y con el fin de investigar el potencial efecto antiviral que los derivados obtenidos podrían tener, primero se llevó a cabo un *screening* cualitativo de las once vainillilamidas sintetizadas. Para ello, células Vero cultivadas en monocapa en placas de 96-*wells* fueron infectadas con VHS-1, cepa KOS, y luego tratadas con diferentes concentraciones de cada una de las vainillilamidas en un rango de 0 a 100  $\mu$ M. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C, se evaluó mediante un microscopio el efecto citopático comparándolo con el control, en el cual la muerte celular provocada por la multiplicación del VHS-1 llegaba a 100%. Se observó que sólo las vainillilamidas **1b** y **1d** reducían en un 50-60% el efecto citopático. Por ello, los sobrenadantes correspondientes se recolectaron y titularon en células Vero para conocer la concentración del virus. Luego, se infectaron células Vero cultivadas en placas de 24-*wells* que se infectaron con diluciones seriadas del virus. Luego de una incubación a 37 °C durante 48 horas las células se fijaron y tiñeron con Cristal Violeta y se contaron las unidades formadoras de placa.

Fue posible observar una inhibición de la replicación viral dependiente de la dosis en los cultivos tratados. Pudimos establecer que **1b** y **1d** (figura 3.9) previenen la multiplicación de VHS-1 en células Vero cuando son agregadas al cultivo luego de la infección, mostrando una inhibición del 50% del rendimiento viral ( $EC_{50}$ ) en concentraciones de 61,69  $\mu\text{M}$  y 26,45  $\mu\text{M}$  respectivamente, tal como se aprecia en la figura 3.10.



**Figura 3.9.** Estructura de los compuestos **1b** y **1d**.

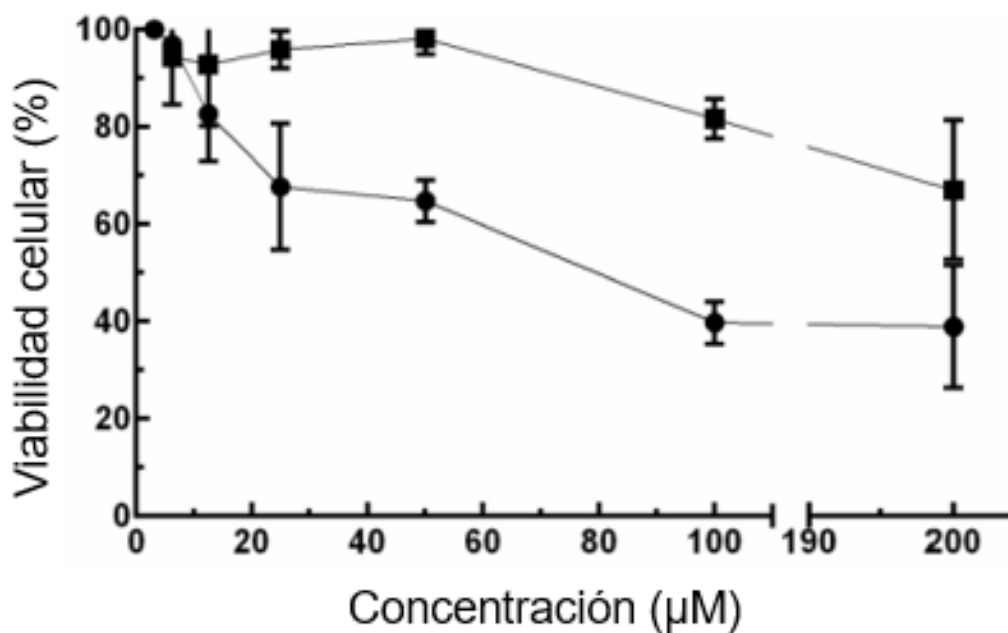


**Figura 3.10.** Actividad antiviral de los compuestos **1b** (■) y **1d** (●). Células Vero cultivadas en placas de 96-wells fueron infectadas con HSV-1 (cepa KOS) y tratadas con las vainillilamidas.

Luego de 24 h de incubación a 37°C se realizó una titulación para el cálculo de la reducción del rendimiento viral.

Para poder descartar un posible efecto citotóxico de los compuestos evaluados, se determinó el 50% de la concentración citotóxica (CC<sub>50</sub>). Con este fin, células Vero cultivadas en placas de 96-wells se trataron con las vainillilamidas **1b** y **1d** en el rango de concentraciones de 0 a 200 µM. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C se llevó adelante un ensayo colorimétrico con MTT.

Como se muestra en la figura 3.11, las vainillilamidas **1b** y **1d** mostraron una CC<sub>50</sub> de 440 µM y 80 µM respectivamente, valores que se encuentran por encima de los EC<sub>50</sub> obtenidos. Los índices de selectividad (SI=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) son de 7,13 y 3,02 luego del tratamiento con **1b** y **1d** respectivamente.

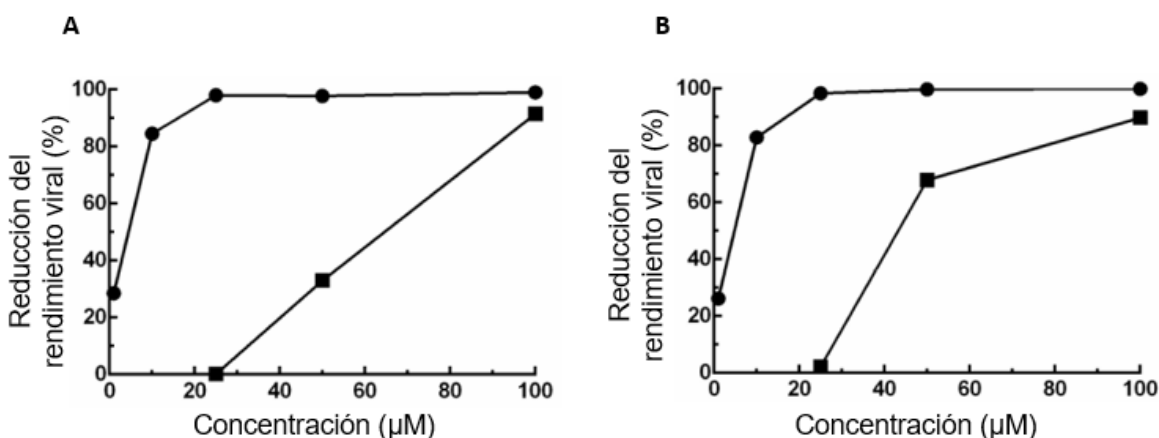


**Figura 3.11.** Citotoxicidad de los compuestos **1b** (■) y **1d** (●). Células Vero cultivadas en placas de 96-wells se trataron con 3.125-200 µM de las vainillilamidas **1b** y **1d** para los ensayos de citotoxicidad. Luego de 24 h de incubación a 37°C se realizó un ensayo colorimétrico con MTT.

Como se mencionó anteriormente, la terapia convencional para el tratamiento de las infecciones por VHS-1 generalmente involucra la utilización de aciclovir (ACV) y otros análogos. Dichas infecciones están caracterizadas por brotes recurrentes que conllevan un tratamiento repetido con ACV, lo que provoca la emergencia de cepas virales resistentes a dicho tratamiento, especialmente en pacientes

inmunosuprimidos.<sup>37</sup> Por esta razón, nos resultó de sumo interés investigar si alguna de las vainillilamidas obtenidas presentaba un efecto inhibitorio sobre cepas de VHS-1 resistentes al aciclovir.

Con dicho objetivo, células Vero cultivadas en monocapa en placas de 96-wells se infectaron con las cepas Field y B2006 (TK-) de VHS-1, y luego se trataron con diferentes concentraciones de **1b** y **1d**. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C, se observó el efecto citopático bajo el microscopio y se comparó con el control. De aquellos wells donde se observó una reducción del efecto citopático causado por el virus se recolectó el sobrenadante y se tituló en células Vero para conocer la concentración viral. Como se muestra en la figura 3.12, en este caso también se observa una relación dosis-respuesta. En el caso de la infección con la cepa Field los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos fueron 65 µM y 4,4 µM con valores de SI de 6,8 y 18,2 para **1b** y **1d** respectivamente, mientras que para la cepa B2006 los valores de EC<sub>50</sub> obtenidos fueron de 44 µM y 4,8 µM con valores de SI de 10 y 16,7 para **1b** y **1d** respectivamente.



**Figura 3.12.** Actividad antiviral de los compuestos **1b** (■) y **1d** (●) contra cepas de VHS-1 resistentes al ACV. (A) Cepa Field. (B) Cepa B2006. Luego de 24 h de incubación a 37°C se realizó una titulación de las células libres y de las asociadas al virus, correspondientes a los tratamientos con **1b** (■) y **1d** (●), así como también un control para el cálculo de la reducción del rendimiento viral.

### 3.10. Conclusiones

En este capítulo se describió la síntesis enzimática de once vainillilamidas por acilación directa de vainillilamina. Se evaluaron varias enzimas y condiciones de reacción en general. Entre los biocatalizadores evaluados, la lipasa obtenida del hongo *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) fue con

la que se obtuvieron los mejores resultados, siendo posible sintetizar *N*-vainillilamidas como el único producto de la reacción con una excelente quimioselectividad.

En resumen, la estrategia descrita en este libro se propone como una alternativa excelente para la síntesis de este tipo de capsaicinoides en comparación con otros métodos anteriormente descritos, que tienen la desventaja de utilizar catalizadores contaminantes o reactivos tales como metales, carbodiimidas, un medio básico fuerte, etc. Este procedimiento catalizado por lipasas utiliza menos reactivos tóxicos y/o contaminantes, y se lleva a cabo a temperatura ambiente usando una cantidad muy pequeña de catalizador y un solvente fácilmente evaporable. El uso de una cantidad pequeña de TLIM, sumado a su bajo costo en comparación con CAL B, que es una de las lipasas más usadas en síntesis, hacen muy conveniente la aplicación de este proceso. Dicha lipasa es biodegradable y, consecuentemente, mucho más amigable con el medio ambiente que los catalizadores químicos. Por otro lado, debido a que el biocatalizador empleado es insoluble en el medio de reacción, puede separarse fácilmente mediante filtración y ser incluso reutilizado.

La diferencia observada en la reactividad de los ácidos grasos nos empujó a llevar a cabo más análisis, que incluyeron estudios por HPLC y nos mostraron que los sustratos con un largo de cadena de entre 12-14 átomos de carbono eran los que más rápido reaccionaban. Adicionalmente, los resultados de simulaciones computacionales nos llevaron a la conclusión de que la diferencia observada en la reactividad queda determinada principalmente por las diferencias en la energía de unión entre los ácidos grasos y el residuo serina del sitio catalítico.

Por otro lado, se evaluó el potencial antiviral de los derivados obtenidos. De las once vainillilamidas estudiadas, dos mostraron un efecto inhibitorio sobre la infección por VHS-1 *in vitro*. Tal como esperábamos, los valores de SI para **1b** y **1d** fueron considerablemente más bajos que los reportados para ACV en la cepa KOS. Pero tanto **1b** como **1d** mostraron una marcada inhibición en la infectividad de las cepas Field y B2006, que son resistentes a ACV. Si bien las infecciones por cepas resistentes no son las más comunes, son un gran problema en pacientes inmunocomprometidos,<sup>38</sup> por ende, estos derivados podrían representar un interesante punto de partida para el estudio de nuevas drogas antiherpéticas para dicha población.

## **Bibliografía**

1. Saadali, B.; Boriky, D.; Blaghen, M.; Vanhaelen, M.; Talbi, M., Alkamides from *Artemisia dracunculus*. *Phytochemistry* **2001**, *58* (7), 1083-1086.
2. Ramsewak, R. S.; Erickson, A. J.; Nair, M. G., Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry* **1999**, *51* (6), 729-732.
3. Bae, S. S.; Ehrmann, B. M.; Etefagh, K. A.; Cech, N. B., A validated liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochemical analysis* **2010**, *21* (5), 438-443.
4. Ross, S. A.; Al-Azeib, M. A.; Krishnaveni, K. S.; Fronczek, F. R.; Burandt, C. L., Alkamides from the Leaves of *Zanthoxylum s yncarpum*. *Journal of natural products* **2005**, *68* (8), 1297-1299.
5. Zacarés, L.; López-Gresa, M. P.; Fayos, J.; Primo, J.; Bellés, J. M.; Conejero, V., Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2007**, *20* (11), 1439-1448.
6. Choi, S.-E.; Kim, T. H.; Yi, S.-A.; Hwang, Y. C.; Hwang, W. S.; Choe, S. J.; Han, S. J.; Kim, H. J.; Kim, D. J.; Kang, Y., Capsaicin attenuates palmitate-induced expression of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by increasing palmitate oxidation and reducing c-Jun activation in THP-1 (human acute monocytic leukemia cell) cells. *Nutrition Research* **2011**, *31* (6), 468-478.
7. Josse, A. R.; Sherriffs, S. S.; Holwerda, A. M.; Andrews, R.; Staples, A. W.; Phillips, S. M., Effects of capsinoid ingestion on energy expenditure and lipid oxidation at rest and during exercise. *Nutrition & metabolism* **2010**, *7* (1), 65.
8. Rios, M. Y.; Olivo, H. F., Natural and synthetic alkamides: applications in pain therapy. In *Studies in natural products chemistry*, Elsevier: 2014; Vol. 43, pp 79-121.
9. Boonen, J.; Bronselaer, A.; Nielandt, J.; Veryser, L.; De Tre, G.; De Spiegeleer, B., Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *Journal of ethnopharmacology* **2012**, *142* (3), 563-590.
10. Rios, M., Drug Discovery Research in Pharmacognosy. *Eds., V. Omboon, SM Olimat, InTech, Croatia* **2012**, 107-144.
11. Choi, S.-H.; Suh, B.-S.; Kozukue, E.; Kozukue, N.; Levin, C. E.; Friedman, M., Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods. *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, *54* (24), 9024-9031.
12. Scoville, W. L., Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **1912**, *1* (5), 453-454.
13. Dou, D.; Ahmad, A.; Yang, H.; Sarkar, F. H., Tumor cell growth inhibition is correlated with levels of capsaicin present in hot peppers. *Nutrition and cancer* **2011**, *63* (2), 272-281.
14. Guzmán, I.; Bosland, P. W., Sensory properties of chile pepper heat—and its importance to food quality and cultural preference. *Appetite* **2017**, *117*, 186-190.

15. Peter, K., *Handbook of herbs and spices*. Woodhead publishing: 2006; Vol. 3.
16. Tainter, D. R.; Grenis, A. T., *Spices and seasonings: a food technology handbook*. John Wiley & Sons: 2001.
17. Collins, M. D.; Wasmund, L. M.; Bosland, P. W., Improved method for quantifying capsaicinoids in Capsicum using high-performance liquid chromatography. *HortScience* **1995**, *30* (1), 137-139.
18. Patapoutian, A.; Tate, S.; Woolf, C. J., Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nature reviews Drug discovery* **2009**, *8* (1), 55-68.
19. Papoiu, A. D.; Yosipovitch, G., Topical capsaicin. The fire of a 'hot' medicine is reignited. *Expert opinion on pharmacotherapy* **2010**, *11* (8), 1359-1371.
20. Gamse, R.; Wax, A.; Zlgonc, R.; Leeman, S., Immunoreactive substance P in sympathetic ganglia: distribution and sensitivity towards capsaicin. *Neuroscience* **1981**, *6* (3), 437-441.
21. Kobata, K.; Saito, K.; Tate, H.; Nashimoto, A.; Okuda, H.; Takemura, I.; Miyakawa, K.; Takahashi, M.; Iwai, K.; Watanabe, T., Long-chain N-vanillyl-acylamides from Capsicum oleoresin. *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**, *58* (6), 3627-3631.
22. Castillo, E.; Torres-Gavilán, A.; Severiano, P.; Arturo, N.; López-Munguía, A., Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. *Food Chemistry* **2007**, *100* (3), 1202-1208.
23. Appendino, G.; Minassi, A.; Morello, A. S.; De Petrocellis, L.; Di Marzo, V., N-Acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of medicinal chemistry* **2002**, *45* (17), 3739-3745.
24. Kobata, K.; Kawamura, M.; Toyoshima, M.; Tamura, Y.; Ogawa, S.; Watanabe, T., Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives. *Biotechnology letters* **1998**, *20* (5), 451-454.
25. Kobata, K.; Toyoshima, M.; Kawamura, M.; Watanabe, T., Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor. *Biotechnology letters* **1998**, *20* (8), 781-783.
26. Kobata, K.; Kobayashi, M.; Tamura, Y.; Miyoshi, S.; Ogawa, S.; Watanabe, T., Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology letters* **1999**, *21* (6), 547-550.
27. Reyes-Duarte, D.; Castillo, E.; Martínez, R.; López-Munguía, A., Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology letters* **2002**, *24* (24), 2057-2061.
28. Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, E., *Asymmetric organic synthesis with enzymes*. John Wiley & Sons: 2008.
29. Quintana, P. G.; Garcia Linares, G.; Chanquia, S. N.; Gorjod, R. M.; Kotler, M. L.; Baldessari, A., Improved Enzymatic Procedure for the Synthesis of Anandamide and N-Fatty Acylalkanolamine Analogues: A Combination Strategy to Antitumor Activity. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016* (3), 518-528.

30. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30* (16), 2785-2791.
31. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry* **1998**, *19* (14), 1639-1662.
32. Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S., A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of computational chemistry* **2007**, *28* (6), 1145-1152.
33. Bottegoni, G.; Rocchia, W.; Recanatini, M.; Cavalli, A., ACIAP, Autonomous hierarchical agglomerative Cluster Analysis based protocol to partition conformational datasets. *Bioinformatics* **2006**, *22* (14), e58-e65.
34. Bourne, N.; Bernstein, D.; Stanberry, L., Civamide (cis-capsaicin) for treatment of primary or recurrent experimental genital herpes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1999**, *43* (11), 2685-2688.
35. Ljungdahl, Å.; Kristensson, K.; Lundberg, J.; Lycke, E.; Svennerholm, B.; Ziegler, R., Herpes simplex virus infection in capsaicin-treated mice. *Journal of the neurological sciences* **1986**, *72* (2-3), 223-230.
36. Stanberry, L. R., Capsaicin interferes with the centrifugal spread of virus in primary and recurrent genital herpes simplex virus infections. *Journal of Infectious Diseases* **1990**, *162* (1), 29-34.
37. Hodge, R. A. V.; Field, H. J., Antiviral agents for herpes simplex virus. In *Advances in pharmacology*, Elsevier: 2013; Vol. 67, pp 1-38.
38. Levin, M. J.; Bacon, T. H.; Leary, J. J., Resistance of herpes simplex virus infections to nucleoside analogues in HIV-infected patients. *Clinical Infectious Diseases* **2004**, *39* (Supplement\_5), S248-S257.



# CAPÍTULO 4

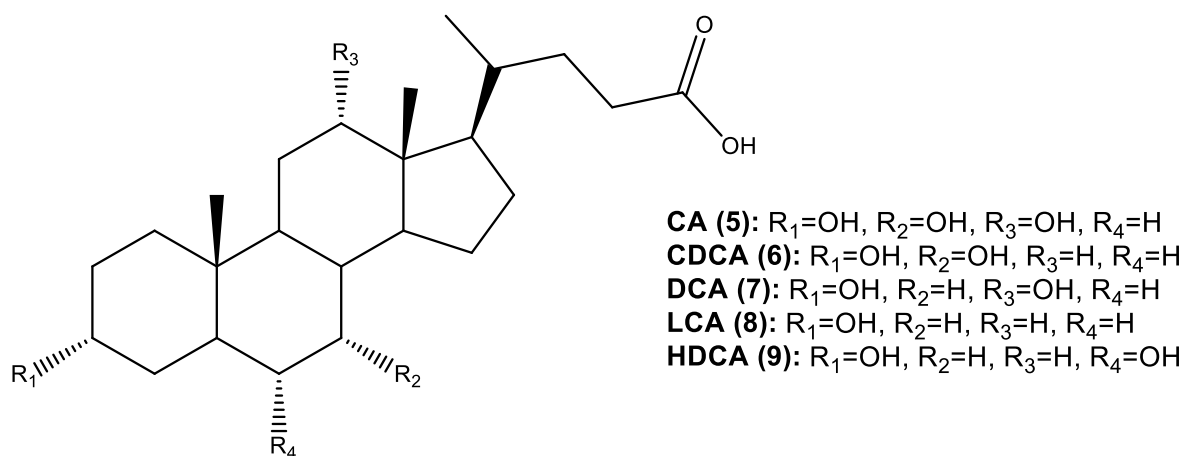
## ***Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hidodesoxicólico***

*En el medio le pasó de todo...*

## 4. Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico

### 4.1. Introducción

Los ácidos biliares se encuentran predominantemente en la bilis de mamíferos y otros vertebrados como metabolitos oxigenados de esteroides, derivados del ácido 5 $\beta$ -colánico.<sup>1,2</sup> Se los clasifica en dos grupos: los ácidos biliares primarios como el ácido cólico (CA) y el quenodesoxicólico (CDCA) que son sintetizados por el hígado, y los ácidos biliares secundarios que son formados debido al metabolismo de los ácidos biliares primarios por parte de enterobacterias, como los ácidos desoxicólico (DCA), litocólico (LCA) e hiodesoxicólico (HDCA). La estructura de todos estos ácidos biliares se detalla en la figura 4.1.

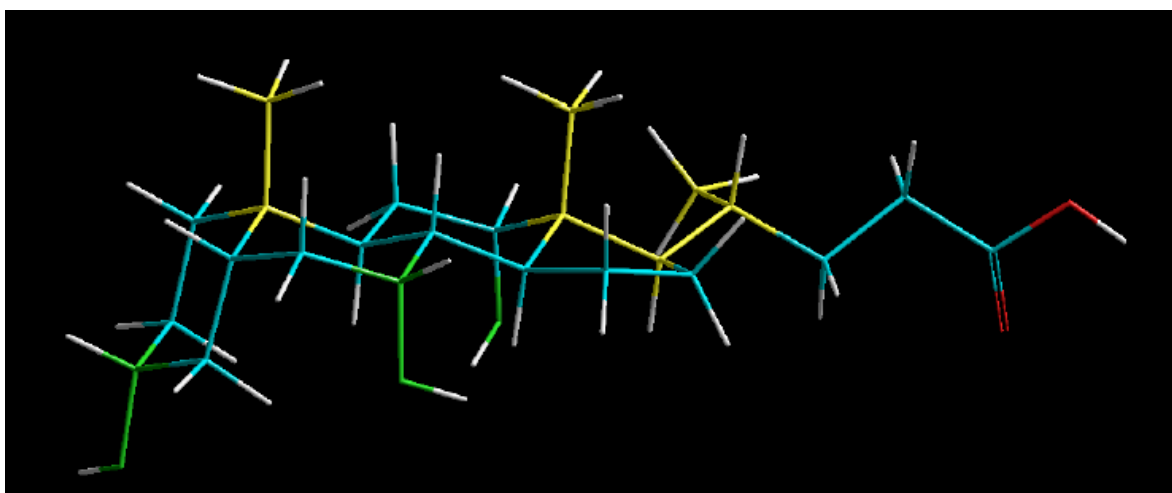


**Figura 4.1.** Estructura de ácidos biliares importantes.

Los ácidos biliares son metabolitos que cumplen un rol muy importante en numerosos procesos biológicos tales como la secreción, la digestión y la regulación del metabolismo del colesterol. Por lo tanto, son objeto de numerosos estudios farmacológicos.<sup>3, 4</sup> Debido a sus propiedades anfifílicas actúan como detergentes biológicos que ayudan en la absorción y disolución de ácidos grasos y vitaminas. Por estas razones los derivados o análogos de ácidos biliares se utilizan ampliamente en la formulación de drogas para mejorar la absorción,<sup>5, 6</sup> y como excipientes que pueden mejorar la penetración a través de la piel,<sup>7, 8</sup> la solubilidad gastrointestinal y la estabilidad de ciertas drogas.<sup>9, 10</sup> Por otro lado, muestran un efecto antagonista selectivo y potente hacia el receptor X farnesoide (FXR),<sup>11</sup> actividad antimicrobiana<sup>12</sup> y anticarcinogénica.<sup>13, 14</sup> Adicionalmente, muestran una

prometedora actividad para el tratamiento de enfermedades humanas relacionadas con procesos inflamatorios.<sup>15</sup>

La naturaleza anfipática de los ácidos biliares a la que se hace referencia en el párrafo anterior, se debe a la presencia de una cara hidrofóbica ( $\beta$ ) que expone los grupos metilo angulares, y otra hidrofílica ( $\alpha$ ), hacia donde se orientan los grupos hidroxilo, tal como se observa en la figura 4.2 tomando como ejemplo al ácido cólico. Es por esta característica particular, que al superar una dada concentración crítica en agua los ácidos biliares forman agregados, que se mantienen gracias a interacciones intermoleculares, principalmente puentes de hidrógeno.



**Figura 4.2.** Estructura tridimensional del ácido cólico, donde pueden apreciarse las dos caras ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de los ácidos biliares. En la cara hidrofóbica ( $\beta$ ) se destacan los grupos metilo en amarillo, mientras que en la cara hidrofílica ( $\alpha$ ) se pueden apreciar los grupos hidroxilo en verde.

Es justamente la relación de área entre las caras hidrofílica e hidrofóbica la que determina en gran medida la actividad biológica de los ácidos biliares, y también la que dificulta su aplicación ya que son poco solubles tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos.

Por otro lado, el ácido hiodesoxicólico (HDCA, compuesto **9**) es el principal constituyente de la bilis de cerdo, y por muchos años se utilizó industrialmente como precursor en la síntesis de otros esteroides. Adicionalmente, HDCA ha demostrado ser útil para inhibir la aterosclerosis en ratones al disminuir sus niveles de colesterol.<sup>16</sup>

## 4.2. Resultados y discusión

Estudios sobre reacciones de esterificación y transesterificación de una variedad de sustratos han demostrado que las lipasas pueden llevar adelante transformaciones sumamente interesantes en el campo de los esteroides, logrando interconversiones selectivas y suaves de grupos funcionales.<sup>17, 18</sup> En nuestro laboratorio ya se trabajó realizando modificaciones sobre pregnanos, androstanos, dehidroepiandrosterona, hidrocortisona, 3,17- $\beta$ -estradiol, drospirenona, y muchos otros.<sup>19-24</sup>

Por otro lado, como ya se mencionó, es común que las aplicaciones de los ácidos biliares dependan de su anfifilia, por lo que en los últimos años en nuestro laboratorio también se llevaron a cabo estudios para aumentar la lipofilia de diversos ácidos biliares.<sup>25-27</sup> En estos trabajos se describe la aplicación de lipasas en reacciones de esterificación, acetilación y alcoholólisis de CDCA, DCA, LCA y CA. Tanto en el caso de CDCA, como de DCA y LCA, se obtuvieron los mejores resultados en reacciones de esterificación y acetilación cuando se utilizó la lipasa de *Candida antarctica B*, así como también éste fue el caso al estudiar reacciones de alcoholólisis sobre los cuatro ácidos biliares mencionados. CA mostró un comportamiento diferente con respecto a los otros tres ácidos estudiados, probablemente debido a la presencia de tres grupos hidroxilos, observándose que para reacciones de esterificación la lipasa de *Rhizomucor miehei* era la más adecuada. Sin embargo, con este ácido no pudo obtenerse ningún producto de acetilación con ninguna de las lipasas estudiadas.

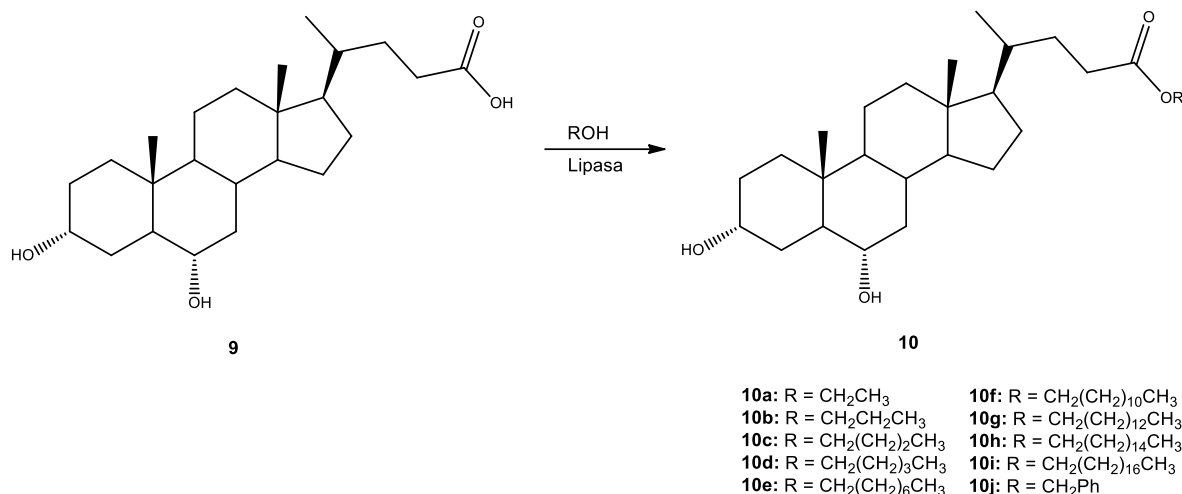
Adicionalmente, y siguiendo la línea de los estudios realizados en nuestro laboratorio en los últimos años, notamos que en comparación con el resto de los ácidos biliares hay muy pocos trabajos realizados sobre HDCA. Siendo un sustrato poco estudiado pensamos que sería interesante analizar su reactividad y obtener una serie de derivados que podrían tener aplicaciones útiles. De esta forma, diseñamos un proceso de síntesis para obtener una serie de productos a partir de HDCA utilizando reacciones de esterificación, acetilación y alcoholólisis, tanto químicas como catalizadas por lipasas.

## 4.3. Esterificación enzimática

De acuerdo a la bibliografía consultada hasta el momento de la escritura de esta tesis, sólo se obtuvieron los ésteres metílico y etílico de HDCA, preparados utilizando metanol o etanol respectivamente con ácido sulfúrico.<sup>28, 29</sup>

Con el objetivo de desarrollar una alternativa más suave para la obtención de ésteres de HDCA, y además, de utilizar dicha estrategia para la obtención de una mayor variedad de ésteres, llevamos adelante reacciones de esterificación catalizadas por lipasas utilizando diferentes alcoholes, tal como se muestra en la figura 4.3. Para optimizar las condiciones de reacción realizamos varios

experimentos, incluyendo la evaluación de varias lipasas, distintas temperaturas, solventes, relación enzima:sustrato (E/S) y alcohol sustrato (Nu/S) utilizando etanol como nucleófilo modelo.



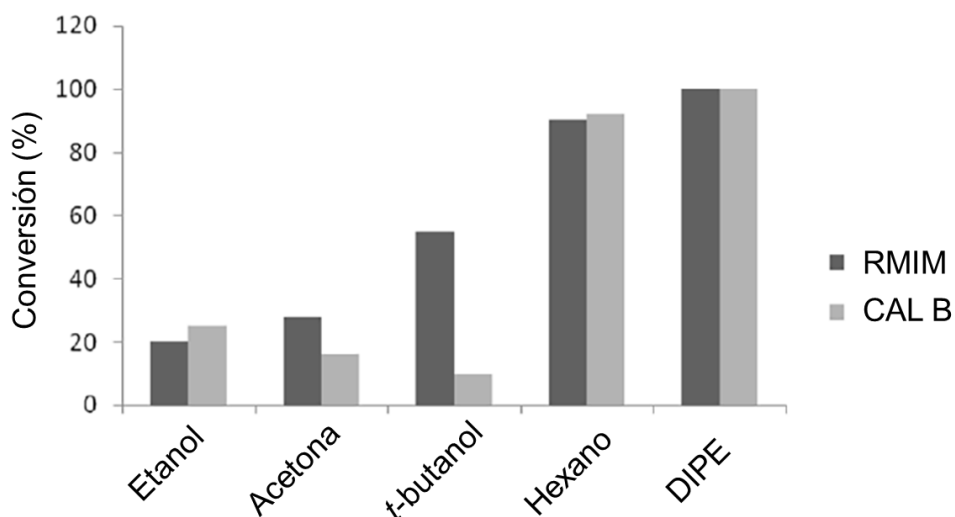
**Figura 4.3.** Esquema de la síntesis enzimática de ésteres de HDCA.

Lo primero que se hizo fue estudiar el comportamiento de varias lipasas de distintas fuentes en la reacción de **9** con etanol. Se utilizaron lipasas provenientes de las levaduras *Candida rugosa* (CRL) y *Candida antarctica B* (CAL B), Lipozima de los hongos *Rhizomucor miehei* (RMIM) y *Thermomyces lanuginosus* (TLIM), y una lipasa inmovilizada naturalmente proveniente de la planta *Carica papaya* (CPL).

Como ya se mencionó, en reacciones biocatalizadas es difícil predecir el efecto del solvente debido a que depende del sustrato utilizado.<sup>30, 31</sup> Por lo tanto para elegir un solvente adecuado es necesario llevar adelante un experimento de *screening*. En este caso los solventes evaluados fueron hexano, diisopropil éter (DIPE), *t*-butanol y acetona. Adicionalmente, se estudió también la reacción de esterificación utilizando etanol como nucleófilo y como solvente. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de reacción para transformaciones similares, las reacciones se llevaron adelante inicialmente a 55 °C, utilizando una relación E/S y Nu/S igual a 10 en ambos casos.

Se evaluaron todas las lipasas mencionadas en todos los solventes, observándose que RMIM y CAL B fueron las más eficientes para la esterificación de HDCA con etanol. En ausencia de biocatalizador, o cuando se utilizó CRL, CPL o TLIM no se obtuvo producto. Tanto RMIM como CAL B fueron sumamente eficientes, obteniéndose en ambos casos el producto (**10a**) con una conversión del 100% luego de 72 hs de reacción. Teniendo en cuenta que RMIM es considerablemente más económica que CAL B, y buscando llevar a cabo el proceso en estudio de la forma más eficiente posible,

optamos por proseguir nuestro trabajo utilizando RMIM. Ambas lipasas fueron más activas en DIPE que en los otros solventes estudiados, y presentaron un comportamiento similar, con la excepción notable del *t*-butanol, donde se obtuvo un rendimiento moderado con RMIM y uno muy bajo al utilizar CAL B, tal como se observa en la figura 4.4. Es destacable notar que incluso utilizando etanol puro se obtiene alrededor de un 20 % de conversión.

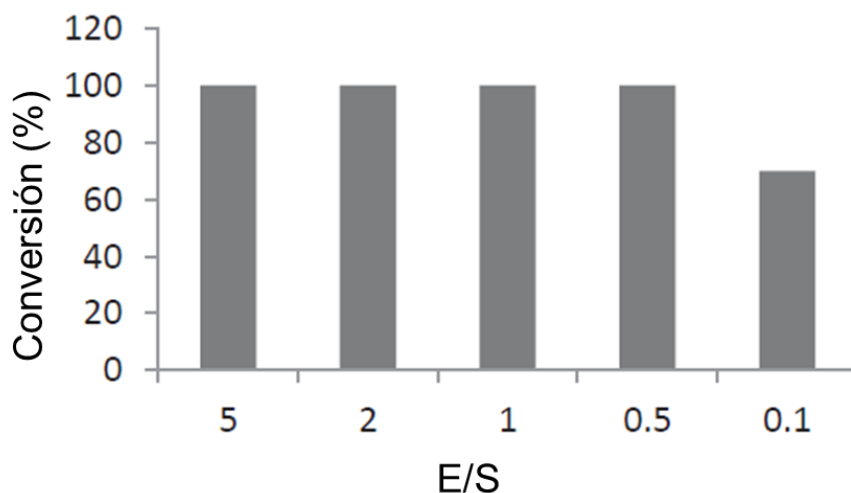


**Figura 4.4.** Efecto del solvente para la esterificación de HDCA. Comparación de las dos lipasas más eficientes entre todas las evaluadas.

Además, se evaluó la influencia de la relación E/S en la reacción de esterificación. Se mantuvo fija la relación Nu/S en 10, se utilizó DIPE como solvente a 55 °C y se utilizaron cantidades variables de RMIM. Tal como puede apreciarse en la figura 4.5, se obtiene una conversión del 100% luego de 72 hs para relaciones tan bajas como una E/S de 0,5. Ésto demuestra la excelente eficiencia de RMIM para esta reacción, ya que esta relación E/S es mucho más baja que la utilizada en trabajos anteriores. Con el objetivo de utilizar la menor cantidad de catalizador posible, ya que es costoso y esto afecta la eficiencia del proceso, elegimos la relación E/S igual a 0,5 como la óptima.

También se evaluó la influencia de la relación Nu/S en el rendimiento de la esterificación. Para ello se utilizó DIPE como solvente, una relación E/S igual a 0,5, y una temperatura de 55 °C. Fue posible observar que con una relación equimolar era suficiente para obtener los mejores resultados. Por último, para analizar la influencia de la temperatura se llevó adelante la reacción a 25 °C, 40 °C y 55 °C, manteniendo el resto de los parámetros de reacción fijos y optimizados (RMIM, DIPE, E/S: 0,5 y Nu/S: 1). Se observó una conversión máxima a 55 °C tras 72 hs de reacción. A temperaturas más bajas se observa una disminución en la conversión obtenida. Adicionalmente, y considerando que

quizás sería posible utilizar un solvente más volátil para la reacción, se evaluó el uso de metil *t*-butil éter a 25 °C y 40 °C. Desafortunadamente, los rendimientos fueron más bajos que con DIPE a 55 °C y por ende decidimos utilizar esta última temperatura y solvente.



**Figura 4.5.** Resultados de los experimentos de screening E/S para la esterificación de HDCA con etanol utilizando RMIM, donde se observa la relación óptima luego de 72 h de reacción.

En resumen, considerando todos los resultados detallados anteriormente concluimos que las condiciones óptimas encontradas para la esterificación enzimática del ácido hiodesoxicólico son: RMIM como biocatalizador, DIPE como solvente, una temperatura de 55 °C, una relación E/S de 0,5 y una relación equimolar Nu/S.

Es interesante observar que HDCA, con dos grupos hidroxilo en posiciones 3 y 6, se comporta de forma distinta a otros ácidos biliares dihidroxilados previamente estudiados en reacciones de esterificación biocatalizadas, teniendo una reactividad más similar al CA, el cual posee tres grupos hidroxilo en posiciones 3, 7 y 12. En el caso de CDCA y DCA, ambos dihidroxilados en posiciones 3,7 y 3,12 respectivamente, CAL B fue el biocatalizador más eficiente, y se utilizaron relaciones E/S y Nu/S mucho mayores, iguales a 10 y 5 respectivamente, hexano como solvente, que en este caso también dio buenos resultados, aunque no tan buenos como DIPE, y una temperatura de 55 °C. Por otro lado, las condiciones óptimas obtenidas para la esterificación de CA fueron RMIM como biocatalizador, una temperatura de 40 °C, E/S igual a 10, Nu/S igual a 20 y DIPE como solvente.

Una vez que se encontraron las mejores condiciones experimentales, éstas se aplicaron a la esterificación de HDCA con distintos alcoholes, obteniéndose los productos **10a-j**. Los resultados, expresados como rendimiento de producto aislado, se encuentran resumidos en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Resultados de la síntesis enzimática de ésteres de HDCA.

Entrada	Nucleófilo	Producto	Rendimiento (%)
1	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	10a	95
2	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	10b	90
3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	10c	82
4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	10d	80
5	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>2</sub> OH	10e	78
6	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>2</sub> OH	10f	83
7	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> CH <sub>2</sub> OH	10g	85
8	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>2</sub> OH	10h	82
9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> CH <sub>2</sub> OH	10i	80
10	PhCH <sub>2</sub> OH	10j	92

Condiciones de reacción: Enzima: RMIM; Solvente: DIPE; Temperatura: 55 °C; E/S: 0,5; Nu/S: 1. Rendimientos calculados tras la purificación pesando los productos.

Los ésteres alquílicos con cadenas carbonadas de entre 2-18 carbonos se obtuvieron con rendimientos de muy buenos a excelentes (78-95%). No se observó ninguna relación entre el rendimiento obtenido y el largo de cadena, de la misma manera que tampoco se observó en el caso de CA en un trabajo anterior. Todos los productos se caracterizaron mediante métodos espectroscópicos, siendo siete de ellos (**10b-10h**) compuestos no descritos anteriormente en literatura. El uso de una relación equimolar de alcohol hace que el procedimiento desarrollado sea sumamente ventajoso, especialmente en el caso de alcoholes de cadena larga, ya que esto simplifica notablemente el proceso global en términos de la complejidad en la purificación, economía y simplicidad global del proceso. Adicionalmente, el catalizador puede ser recuperado de forma sencilla mediante filtración y volver a utilizarse, conservando un excelente nivel de actividad luego de cinco ciclos de reacción.

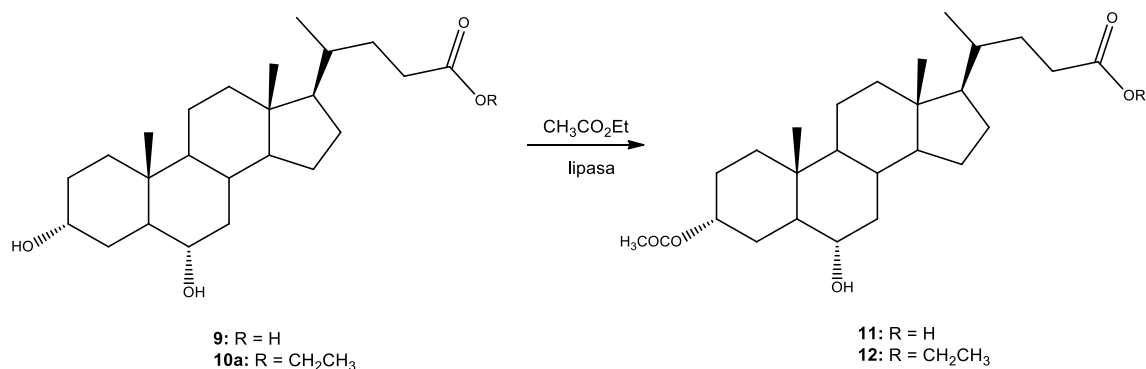


#### 4.4. Acetilación enzimática

Hasta donde sabemos, aún no se han descrito en bibliografía derivados monoacetilados de HDCA. Sí se encuentran descritas reacciones no regioselectivas de diacetilación, como por ejemplo el trabajo de De Marino *et al.* (*Scientific reports* 2017). De forma análoga a como se hace con otros ácidos biliares, la diacetilación de HDCA se suele llevar adelante a temperatura ambiente en anhídrido acético, DMAP y piridina.

Recientemente en nuestro laboratorio se reportó la síntesis de derivados 3 $\alpha$ -acetilados de los ácidos quenodesoxicólico y desoxicólico usando CAL B como catalizador. Utilizando las mismas condiciones de reacción, pero con ácido litocólico como sustrato, se observó que la lipasa cataliza tanto la acetilación como la esterificación dando como único producto etil litocolato 3 $\alpha$ -acetato, en un proceso *one pot-two steps*. En el caso del ácido cólico sólo se pudo acetilar enzimáticamente su éster etílico, reacción que fue regioselectiva dando como producto el derivado 3 $\alpha$ -acetilo.

Considerando estos antecedentes, planificamos una acetilación regioselectiva de HDCA como la que se muestra en la figura 4.6.



**Figura 4.6.** Síntesis enzimática de derivados acetilados de HDCA (**9**) y su éster etílico (**10a**).

En un primer paso aplicamos las condiciones óptimas desarrolladas en trabajos anteriores para la acetilación de CDCA y DCA: utilizamos CAL B como biocatalizador, acetato de etilo como agente acilante, E/S: 5, A/S: 5, usando hexano como solvente a 55 °C. El derivado 3 $\alpha$ -acetilado (**11**) se obtuvo con un rendimiento excelente luego de una hora de reacción. La lipasa utilizada mostró un comportamiento completamente regioselectivo, reaccionando exclusivamente con el grupo hidroxilo situado en la posición 3 en las condiciones evaluadas.

Teniendo en cuenta que aplicando las condiciones de acetilación para CDCA obtuvimos un 100% de conversión para HDCA, decidimos llevar adelante la reacción utilizando relaciones E/S más bajas. Aplicando una relación E/S igual a 1 la reacción se dio por finalizada en tres horas, mientras que con una relación E/S de 0,5 finalizó a las 24hs. Nuevamente podemos destacar que el hecho de que sea posible utilizar cantidades tan bajas de biocatalizador representa una excelente característica de esta metodología de síntesis.

Las mismas condiciones (CAL B, acetato de etilo, hexano, E/S:0,5, A/S: 5, 55 °C) se utilizaron para llevar adelante la acetilación del éster etílico **10a**. Nuevamente se observó acetilación en la posición 3, obteniendo como resultado el producto **12** luego de 8 hs de reacción. La acetilación de HDCA también se evaluó utilizando RMIM como biocatalizador, pero lamentablemente no se observó formación de producto luego de 24 hs de reacción y por eso esta enzima no se siguió utilizando para dicho fin.

Es importante destacar las diferencias significativas observadas en el tiempo de reacción para la acetilación de HDCA en comparación con CDCA y DCA. Mientras que el compuesto **11** se obtuvo luego de una hora de reacción, los derivados 3-acetilados de los otros ácidos biliares no se obtuvieron antes de 48 hs. Se observó también que, si la mezcla de reacción se deja bajo agitación continua por cinco días, también ocurre la reacción de esterificación, obteniéndose 3-acetil hiodesoxicolato de etilo (**12**). Estos resultados sugieren que no es posible acetilar la posición 6 aplicando esta metodología y que, por otro lado, el etanol generado durante la reacción de acetilación es capaz de esterificar al grupo carboxilo si se deja reaccionar el tiempo suficiente. En trabajos anteriores del laboratorio ya se había observado el mismo comportamiento para la acetilación catalizada por CAL B de ácido litocólico.

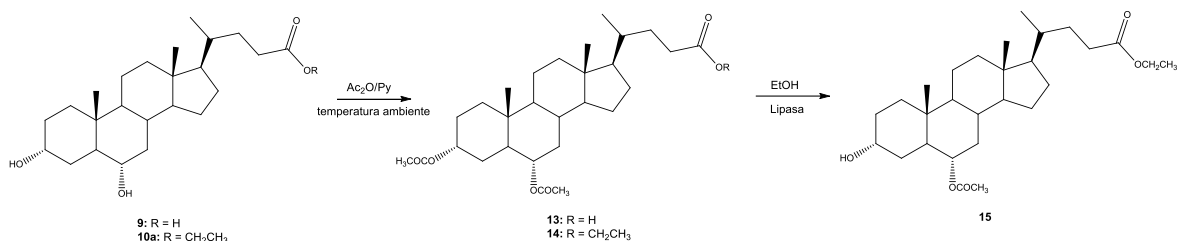
Finalmente, es remarcable también la diferencia observada en los tiempos de reacción de HDCA para la acetilación (1 h) en comparación con la esterificación (72 hs).

Con el objetivo de aplicar esta metodología no sólo en acetilaciones, sino en acilaciones en general, buscamos llevar a cabo la reacción también con pivalato de etilo y benzoato de etilo, cuyos productos de acilación son sumamente interesantes como intermediarios sintéticos, ya que pueden actuar como grupos protectores. Lamentablemente, no obtuvimos resultados satisfactorios con esta metodología.

#### **4.5. Alcohólisis enzimática**

Para poder obtener el derivado 6-acetilado de HDCA desarrollamos una estrategia de dos pasos, detallada en la figura 4.7. En primer lugar, realizamos una peracetilación química tanto de HDCA como de su éster etílico, seguida de una alcohólisis enzimática. Los productos de peracetilación, **13**

y **14**, se obtuvieron con rendimientos muy buenos, de 89% y 85% respectivamente, tratando **9** y **10a** con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente durante 16 hs.



**Figura 4.7.** Síntesis química y alcoholisis enzimática de derivados peracetilados de HDCA (**9**) y del éster etílico de HDCA (**10a**).

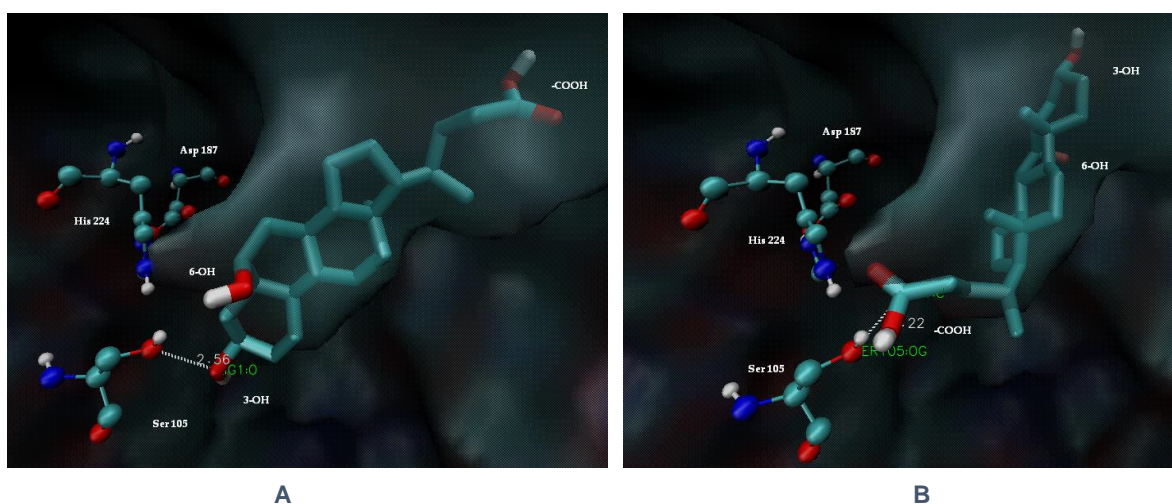
La alcoholisis enzimática de **13** y **14** se llevó a cabo aplicando las condiciones óptimas determinadas para la alcoholisis de ácido quenodesoxicólico peracetilado: CAL B como biocatalizador (E/S: 5), etanol como nucleófilo (Nu/S: 1,2), hexano como solvente y una temperatura de 55 °C. Para ambos sustratos la lipasa mostró un comportamiento regioselectivo, reaccionando solamente en la posición 3. Utilizando estas condiciones obtuvimos 6-acetil hiodesoxicolato de etilo (**15**) a partir de **14** con un rendimiento excelente (89%) luego de dos horas de reacción. Análogamente a lo observado en trabajos anteriores, cuando se parte de **13** la reacción de alcoholisis también da como producto **15** (92% de rendimiento), utilizándose el etanol tanto como agente para la alcoholisis como para la esterificación. En este caso, cuando la reacción era controlada a tiempos cortos de reacción mediante TLC se observó la formación de otro compuesto en proporción muy baja, que al avanzar la reacción desaparecía para formar **15**. Probablemente este compuesto corresponda al ácido 6-acetil hiodesoxicólico, que se esterifica rápidamente. En ambos casos CAL B se comportó de forma regioselectiva, al igual que en las reacciones de acetilación, lo cual demuestra que este proceso es una alternativa interesante y eficiente para obtener varios derivados, de acuerdo a lo hallado en trabajos previos.<sup>32</sup>

#### 4.6. Modelado molecular

Al analizar los resultados experimentales obtenidos, observamos que la enzima CAL B acelera mucho más la reacción de acetilación que la de esterificación. Para poder comprender mejor las características moleculares que provocan estas diferencias en la tasa de conversión del ácido hiodesoxicólico, decidimos llevar adelante un estudio de modelado molecular. De esta manera

buscamos establecer cómo es el ingreso del esteroide en el bolsillo hidrofóbico de la lipasa, lo cual podría dar indicios de porqué se observa la selectividad antes mencionada.

La simulación computacional nos llevó a la selección de una serie de posibles conformaciones para la aproximación del HDCA al sitio activo de CAL B (Asp187-His224-Ser105), siendo las más significativas las que se muestran en la figura 4.8.



**Figura 4.8.** Resultados del estudio de docking utilizando CAL-B: **(A)** Aproximación del grupo 3-OH al sitio catalítico (acetilación). **(B)** Aproximación del grupo carboxilo (esterificación).

En cada conformación es posible apreciar cómo el sustrato alcanza la tríada catalítica a través del bolsillo. Siguiendo los parámetros descritos en el capítulo 3, pudimos concluir que la aproximación del ácido hiedesoxicólico orientado de forma tal que el grupo 3-OH quede dirigido hacia la tríada catalítica es mucho más favorable que la aproximación a través del grupo carboxilo. Además, hallamos que la distancia entre la Ser105 catalítica y el grupo 6-OH es más grande que la distancia entre el mismo aminoácido y el grupo 3-OH (5,36 Å y 2,56 Å respectivamente), lo cual podría explicar los resultados experimentales, en los cuales hallamos que la acetilación enzimática es mucho más rápida que la esterificación y, además, es regioselectiva, obteniéndose sólo el producto acetilado en la posición 3.

Como ya se mencionó anteriormente en este capítulo, al utilizar hexano como co-solvente observamos que a tiempos de reacción muy largos el etanol formado tras realizar una acetilación con acetato de etilo reacciona para formar un éster etílico, lo cual refuerza la evidencia hallada en nuestros estudios, donde la acilación es mucho más rápida que la esterificación.

#### 4.7. Conclusiones

En este capítulo se describe la síntesis de derivados de ácido hiedesoxicólico, doce de ellos compuestos nuevos, de una forma regioselectiva utilizando enzimas como catalizadores. Aplicando esta metodología conseguimos controlar la reacción de forma precisa, logrando excelentes rendimientos de forma rápida y, en varios casos, obteniendo un solo producto.

Dentro de todos los parámetros de reacción estudiados en cada etapa se destaca el uso de varias lipasas diferentes, obteniendo los mejores resultados para la obtención de distintos ésteres tanto con *Candida antarctica* B así como con Lipozima de *Rhizomucor miehei*. Dado que la lipasa RMIM es mucho más barata que CAL B, y considerando la aplicabilidad global del proceso desarrollado decidimos inclinarnos por el uso de RMIM para llevar adelante las esterificaciones. Otro aspecto destacable del método sintético desarrollado es la baja relación E/S empleada, lo que hace que el proceso tenga una alta eficiencia.

Por otro lado, se desarrolló una metodología para la acetilación regioselectiva de HDCA, utilizándose CAL-B tanto para la acetilación como para la alcoholisis.

Adicionalmente, se utilizaron herramientas de modelado molecular para explicar en detalle las diferencias observadas en reactividad en los distintos grupos funcionales de la molécula de HDCA, así como también para entender en profundidad cómo interactúa este sustrato con el sitio catalítico de una lipasa ampliamente utilizada en síntesis, como lo es CAL B.

En resumen, en este capítulo no sólo se presenta la síntesis de varios compuestos obtenidos a partir de un sustrato que fue evitado durante muchos años, sino que también lo hacemos de forma simple y amigable con el medio ambiente aplicando reacciones a temperaturas moderadas y con purificaciones sencillas.

## **Bibliografía**

1. Setchell, K. D.; Kritchevsky, D.; Nair, P. P., *The bile acids: chemistry, physiology, and metabolism: volume 4: methods and applications*. Springer Science & Business Media: 2012.
2. Karpen, H. E.; Karpen, S. J., Bile Acid Metabolism During Development. In *Fetal and Neonatal Physiology*, Elsevier: 2017; pp 913-929. e4.
3. Hofmann, A. F.; Hagey, L. R., Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades. *Journal of lipid research* **2014**, *55* (8), 1553-1595.
4. Feher, J. J., *Quantitative human physiology: an introduction*. Academic press: 2017.
5. Hassan, N.; Ahad, A.; Ali, M.; Ali, J., Chemical permeation enhancers for transbuccal drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2010**, *7* (1), 97-112.
6. Stojančević, M.; Pavlović, N.; Goločorbin-Kon, S.; Mikov, M., Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Frontiers in Life Science* **2013**, *7* (3-4), 112-122.
7. Jampilek, J.; Brychtova, K., Azone analogues: classification, design, and transdermal penetration principles. *Medicinal research reviews* **2012**, *32* (5), 907-947.
8. Cirri, M.; Maestrelli, F.; Mennini, N.; Mura, P., Combined use of bile acids and aminoacids to improve permeation properties of acyclovir. *International journal of pharmaceutics* **2015**, *490* (1-2), 351-359.
9. Yang, L.; Zhang, H.; Fawcett, J. P.; Mikov, M.; Tucker, I. G., Effect of bile salts on the transport of morphine-6-glucuronide in rat brain endothelial cells. *Journal of pharmaceutical sciences* **2011**, *100* (4), 1516-1524.
10. Yang, L.; Fawcett, J. P.; Østergaard, J.; Zhang, H.; Tucker, I. G., Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. *Molecular pharmaceutics* **2012**, *9* (1), 29-36.
11. Yu, D.; Mattern, D. L.; Forman, B. M., An improved synthesis of 6 $\alpha$ -ethylchenodeoxycholic acid (6ECDCA), a potent and selective agonist for the Farnesoid X Receptor (FXR). *Steroids* **2012**, *77* (13), 1335-1338.
12. Bansal, S.; Singh, M.; Kidwai, S.; Bhargava, P.; Singh, A.; Sreekanth, V.; Singh, R.; Bajaj, A., Bile acid amphiphiles with tunable head groups as highly selective antitubercular agents. *MedChemComm* **2014**, *5* (11), 1761-1768.
13. Brossard, D.; El Kihel, L.; Clément, M.; Sebbahi, W.; Khalid, M.; Roussakis, C.; Rault, S., Synthesis of bile acid derivatives and in vitro cytotoxic activity with pro-apoptotic process on multiple myeloma (KMS-11), glioblastoma multiforme (GBM), and colonic carcinoma (HCT-116) human cell lines. *European journal of medicinal chemistry* **2010**, *45* (7), 2912-2918.
14. Gadaleta, R. M.; Garcia-Irigoyen, O.; Moschetta, A., Bile acids and colon cancer: Is FXR the solution of the conundrum? *Molecular aspects of medicine* **2017**, *56*, 66-74.

15. Li, T.; Chiang, J. Y., Bile acids as metabolic regulators. *Current opinion in gastroenterology* **2015**, *31* (2), 159.
16. Shih, D. M.; Shaposhnik, Z.; Meng, Y.; Rosales, M.; Wang, X.; Wu, J.; Ratiner, B.; Zadini, F.; Zadini, G.; Lusi, A. J., Hyodeoxycholic acid improves HDL function and inhibits atherosclerotic lesion formation in LDLR-knockout mice. *The FASEB Journal* **2013**, *27* (9), 3805-3817.
17. Ferrero, M.; Gotor, V.; Patel, R., Stereoselective biocatalysis. *Marcel Dekker, New York* **2000**, 579.
18. Swizdor, A.; Kolek, T.; Panek, A.; Milecka, N., Selective modifications of steroids performed by oxidative enzymes. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16* (21), 2551-2582.
19. Bruttomesso, A. C.; Baldessari, A., Lipase-catalysed deacetylation of androstane and pregnane derivatives: influence of ring D substitution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, *29* (1-6), 149-153.
20. Baldessari, A.; Bruttomesso, A. C.; Gros, E. G., Lipase-Catalysed Regioselective Deacetylation of androstane derivatives. *Helvetica chimica acta* **1996**, *79* (4), 999-1004.
21. Bruttomesso, A. C.; Tiscornia, A.; Baldessari, A., Lipase-catalyzed preparation of biologically active esters of dehydroepiandrosterone. *Biocatalysis and Biotransformation* **2004**, *22* (3), 215-220.
22. Quintana, P. G.; Baldessari, A., Lipase-catalyzed regioselective preparation of fatty acid esters of hydrocortisone. *Steroids* **2009**, *74* (13-14), 1007-1014.
23. Monsalve, L. N.; Rada, M. Y. M.; Ghini, A. A.; Baldessari, A., An efficient enzymatic preparation of 20-pregnane succinates: chemoenzymatic synthesis of 20 $\beta$ -hemisuccinyloxy-5 $\alpha$ H-pregnan-3-one. *Tetrahedron* **2008**, *64* (8), 1721-1730.
24. Quintana, P. G.; Romero, S. M.; Vaamonde, G.; Baldessari, A., New metabolites of drospirenone obtained in Mucorales fungi culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *97*, 110-117.
25. Quintana, P. G.; Canet, A.; Marciello, M.; Valero, F.; Palomo, J. M.; Baldessari, A., Enzyme-catalyzed preparation of chenodeoxycholic esters by an immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, *118*, 36-42.
26. Liñares, G. G.; Zígolo, M. A.; Simonetti, L.; Longhi, S. A.; Baldessari, A., Enzymatic synthesis of bile acid derivatives and biological evaluation against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23* (15), 4804-4814.
27. Zígolo, M. A.; Liñares, G. G.; Baldessari, A., New cholic acid derivatives: Biocatalytic synthesis and molecular docking study. *Steroids* **2016**, *107*, 10-19.
28. Haslewood, G., Comparative studies of bile salts'. 7. Bile acids of the coypu, *Myocastor coypus*. *Biochemical Journal* **1954**, *56* (4), 581.
29. Haslewood, G., Comparative studies of bile salts'. 9. The isolation and chemistry of hyocholic acid. *Biochemical Journal* **1956**, *62* (4), 637.
30. Carrea, G.; Riva, S., *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*. John Wiley & Sons: 2008.

31. Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, E., *Asymmetric organic synthesis with enzymes*. John Wiley & Sons: 2008.
32. Baldessari, A., Lipases as catalysts in synthesis of fine chemicals. In *Lipases and Phospholipases*, Springer: 2012; pp 445-456.



# CAPÍTULO 5

## ***Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH***

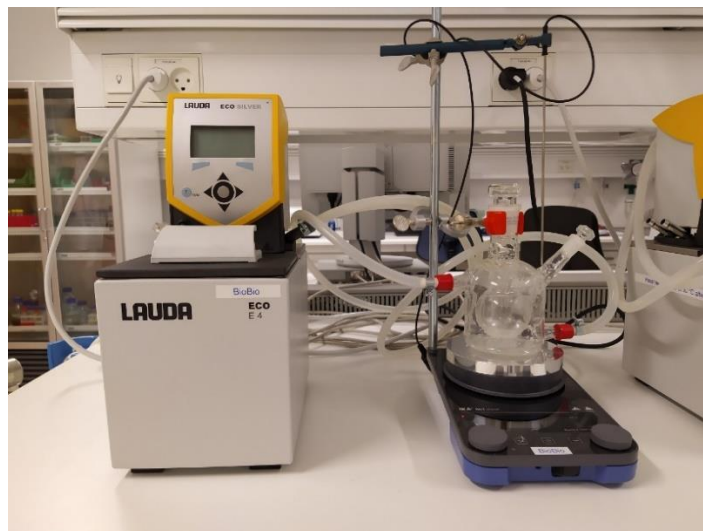
*...y así fue que se dio cuenta...*

## **5. Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH**

### **5.1. Introducción**

Al desarrollar un nuevo proceso biocatalítico, siempre uno de los pasos más importantes es la elección del solvente. En la actualidad el agua es el solvente más frecuentemente utilizado, aunque su polaridad es una gran desventaja debido a que, en muchas ocasiones, los sustratos utilizados son hidrofóbicos, lo cual acarrea problemas de solubilidad. Por otro lado, la biocatálisis en medios no acuosos como líquidos iónicos, fluidos supercríticos y solventes orgánicos, como por ejemplo los procesos detallados en los capítulos anteriores de este libro, presentan grandes ventajas tales como una mejor solubilidad de los sustratos, desplazamientos positivos del equilibrio, supresión de reacciones secundarias dependientes de la presencia de agua, entre otras.

En las últimas décadas se han encontrado numerosas aplicaciones para los líquidos iónicos como medio de reacción, sin embargo, éstas se ven limitadas debido a las dificultades técnicas que conlleva el trabajo con este tipo de solventes, así como su alto costo y baja biodegradabilidad. En este contexto, el uso de solventes eutécticos profundos (DES) se presenta como una alternativa interesante a los líquidos iónicos tradicionales.<sup>1,2</sup> Como se mencionó en la introducción, los DES son solventes eutécticos que pueden prepararse de forma sencilla utilizando un sistema como el de la figura 5.1, mezclando un aceptor de unión de hidrógeno (HBA) con un donador de unión de hidrógeno (HBD), mientras se calienta y se agita la mezcla hasta que se torna líquida.<sup>3</sup> Una vez que esto ocurre, la mezcla se mantiene líquida a temperatura ambiente debido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares.

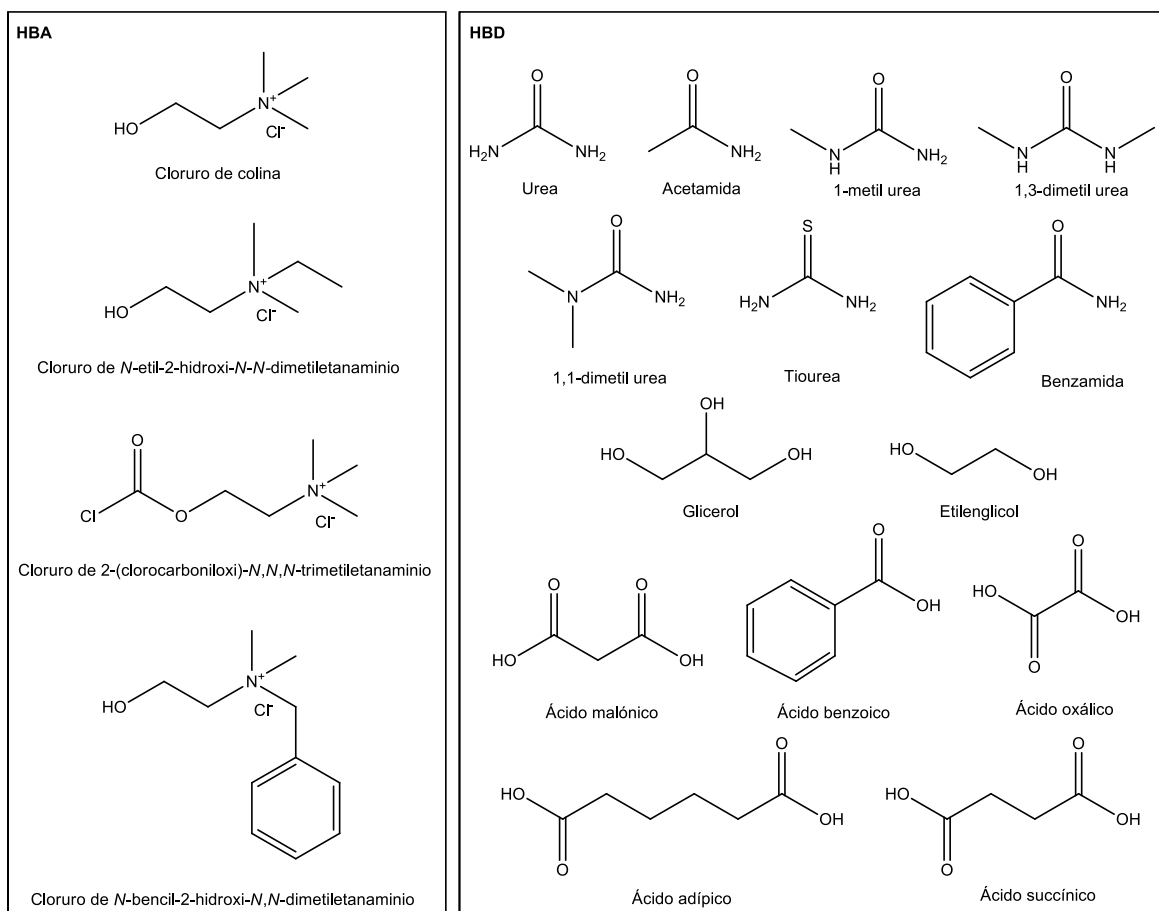


**Figura 5.1.** Sistema para la preparación de DES. Fotografía realizada por el autor.

Una característica destacable de los DES es que pueden producirse de forma económica, utilizando por ejemplo sales de amonio cuaternarias como cloruro de colina (ChCl, también llamada vitamina B4), que se fabrica en una escala de varios millones de toneladas por año,<sup>4</sup> en combinación con HBDs de fuentes renovables como azúcares, aminoácidos, alcoholes, o incluso desechos industriales como glicerol. Cuando los DES están compuestos por sustratos naturales, se los suele llamar solventes eutécticos profundos naturales o NADES. En la figura 5.2 se detallan las estructuras de algunos de los sustratos que pueden utilizarse para obtener DES.

Cada vez más estudios consideran a los DES como una alternativa aceptable, o incluso mejor a los solventes comunes para llevar a cabo biotransformaciones. Este crecimiento en el uso de los DES puede deberse al hecho de que estos solventes pueden diseñarse de forma tal que sean no tóxicos, no volátiles, no inflamables e incluso biodegradables, por lo que suele considerarse a los DES como solventes “verdes”.<sup>5</sup>

Además, gracias a que es posible desarrollar distintos DES a partir de una gran variedad de sustratos, y también pueden ajustarse sus propiedades variando la proporción de HBA/HBD y agua o buffer, es posible hacer DES personalizados para distintas aplicaciones. Esta adición de agua como cosolvente (hasta un 20 % v/v) permite que el medio no sea tan viscoso manteniendo la naturaleza del solvente,<sup>6</sup> lo que es particularmente útil en procesos continuos.<sup>7</sup>



**Figura 5.2.** Estructura de algunas sales y de donores de puente de hidrógeno comúnmente usados en la formulación de DES.

Por otro lado, en las últimas décadas las oxidoreductasas (EC1) se han vuelto cada vez más importantes en síntesis orgánica, debido a su gran actividad y excelente selectividad al ser aplicadas en procesos redox. Dichas enzimas pueden catalizar reacciones que van desde la reducción de enlaces carbonílicos y dobles enlaces carbono-carbono, hasta hidroxilaciones, epoxidaciones y reacciones de Baeyer-Villiger.<sup>8-12</sup> En particular, la aplicación de alcohol deshidrogenasas (ADH, EC 1.1.1.1.) representa actualmente un método sustentable y eficiente para la síntesis de alcoholes, incluyendo los ópticamente activos, a partir de compuestos carbonílicos.<sup>13, 14</sup>

Este tipo de catalizadores son dependientes del uso de cofactores como nicotinamida (NAD(P)H), que actúan como donores/aceptores de electrones en procesos de reducción. El uso de estos cofactores en cantidades estequiométricas se encuentra limitado por efectos de inhibición, así como por su elevado costo. Por ello, es necesario utilizarlos en cantidades catalíticas y combinados con sistemas de regeneración *in situ*,<sup>15</sup> lo cual normalmente implica una segunda reacción enzimática,

generalmente mediada por glucosa deshidrogenasa (GDH)<sup>16</sup> o formiato deshidrogenasa (FDH) y un cosustrato adecuado. Alternativamente también pueden utilizarse métodos químicos, electroquímicos o fotoquímicos de regeneración,<sup>17-19</sup> así como cofactores sintéticos de menor costo en cantidades estequiométricas.<sup>20</sup> Entre todas las estrategias de regeneración de NAD(P)H mencionadas, la oxidación mediada por ADH de alcoholes simples es probablemente la más común, siendo especialmente elegante si la misma ADH es utilizada en las dos reacciones del ciclo, conformando una versión biocatalítica de la reducción de Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV).<sup>21-23</sup> Sin embargo, es común que estas reducciones tengan inconvenientes tales como su reversibilidad y una fuerza impulsora débil, lo que hace necesario utilizar un exceso considerable del cosustrato o llevar a cabo una remoción del producto que puede ser compleja.

## 5.2. Resultados y discusión

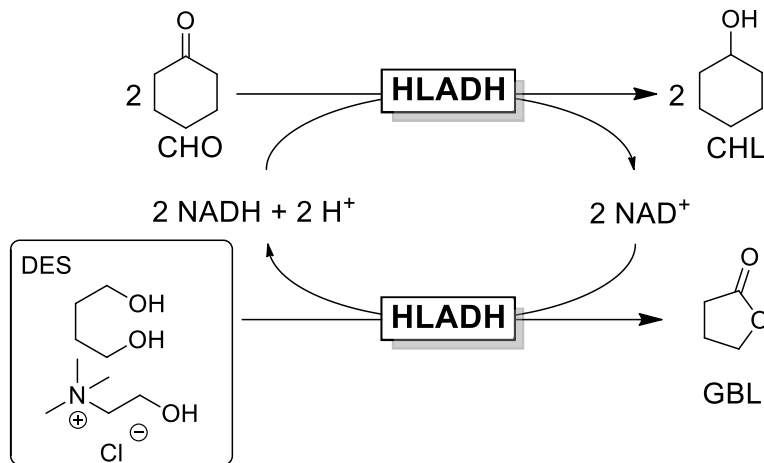
Considerando lo expuesto anteriormente, así como varios trabajos recientes,<sup>24-27</sup> decidimos dar un paso más en los procesos de reducción para la síntesis de compuestos de interés en DES y combinar éstos con el concepto de “cosustratos inteligentes” por primera vez.

Es un hecho conocido que la ADH de hígado de caballo (HLADH por sus siglas en inglés) puede aceptar una gran variedad de dioles como sustrato, para producir lactonas enantioméricamente puras como producto.<sup>28-31</sup> Teniendo ésto en cuenta, elegimos HLADH como la enzima para llevar adelante el proceso de reducción, y preparamos un DES a partir de cloruro de colina (ChCl) y 1,4-butanodiol (1,4-BD). Este solvente es un medio adecuado para que el proceso ocurra. A la vez uno de sus componentes, el 1,4-BD, puede desplazar el equilibrio de la reducción MPV al oxidarse a  $\gamma$ -butirolactona (GBL), que es un subproducto termodinámicamente estable e inerte, tal como se ve en la figura 5.3.

De esta forma, utilizamos el solvente como parte de la reacción, evitando la adición de cualquier otro reactivo, lo cual simplifica el proceso de gran manera y lo hace mucho más eficiente y sostenible.

Aplicando esta metodología novedosa, proponemos un sistema para la reducción de diferentes sustratos carbonílicos utilizando tanto HLADH libre como inmovilizada en el laboratorio, así como también se estudia la aplicabilidad de este proceso en una escala mayor.

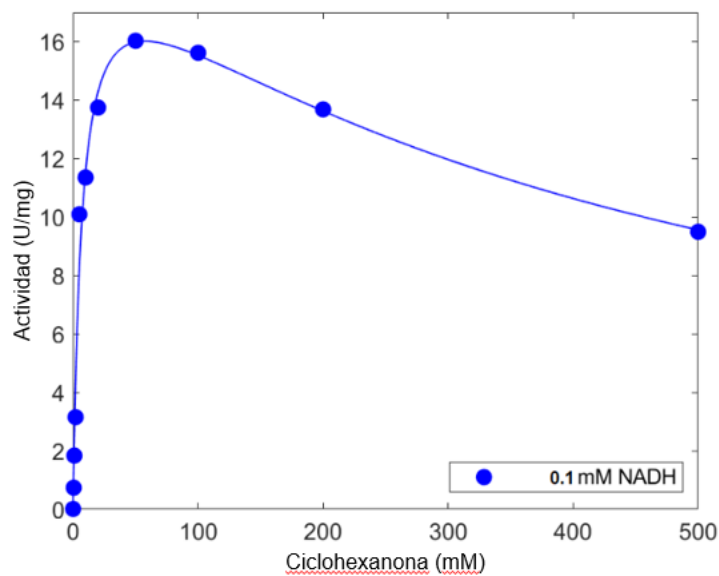
La investigación que se describe en este capítulo se llevó a cabo durante una estadía que realicé en el Departamento de Ingeniería de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, en el grupo dirigido por la Dra. Selin Kara.



**Figura 5.3.** Sistema propuesto para la reducción de ciclohexanona (CHO) a ciclohexanol (CHL) catalizada por HLADH utilizando una mezcla DES-buffer y 1,4-BD como HBD.

### 5.3. Producción y caracterización de HLADH

Produjimos y purificamos la enzima HLADH a partir del plásmido expresándola en *E. coli*, y medimos su actividad mediante espectrofotometría UV-Vis para un rango de concentraciones de CHO de entre 0 mM hasta 500 mM. Al hacer esto notamos un claro efecto inhibitorio a altas concentraciones de sustrato, como se observa en la figura 5.4.



**Figura 5.4.** Actividad de HLADH para distintas concentraciones de CHO.

Los parámetros cinéticos obtenidos de este estudio se muestran en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Parámetros cinéticos para la HLADH obtenida

$v_{\max}$ (U/mg)	$K_M$ (mM)	$K_i$ (mM)	$K_i/K_M$
$19.97 \pm 1.33$	$7.10 \pm 1.31$	$465 \pm 112$	65.5

#### 5.4. Optimización de condiciones de reacción

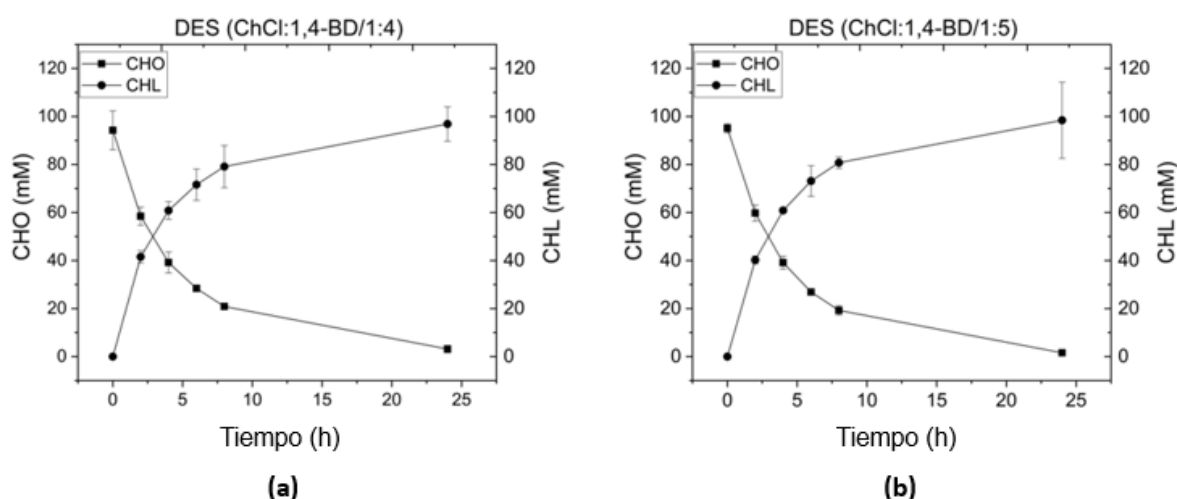
Preparamos tres DES distintos variando la relación molar entre ChCl y 1,4-BD, siendo éstas de 1:3, 1:4, y 1:5. Para llevar adelante las reacciones solamente utilizamos aquellos DES con relación 1:4 y 1:5, ya que el DES restante formó dos fases tras ser almacenado a temperatura ambiente por algunas horas, como se ve en la figura 5.5.



**Figura 5.5.** Detalle de los DES preparados tras ser almacenados 24 hs. Observar el precipitado blanco de ChCl en la botella correspondiente al DES con relación 1:3 (izquierda), es decir, aquel con mayor proporción de ChCl.

Para estudiar el sistema propuesto y averiguar las mejores condiciones experimentales, decidimos utilizar ciclohexanona como sustrato modelo, que daría lugar a ciclohexanol como producto de reducción. Para comenzar con el estudio de la aplicabilidad de los DES preparados, lo primero que hicimos fue analizar cuál de los dos (1:4 o 1:5) funcionaba mejor en combinación con una cantidad de buffer Tris-HCl (50mM, pH 7.5) de 20% v/v. Esto es fundamental al realizar reacciones biocatalíticas en DES, ya que de otra manera la viscosidad del solvente puede acarrear problemas de transferencia de masa.

Para nuestra satisfacción, tal y como se observa en la figura 5.6., los dos DES evaluados mostraron una conversión cuantitativa de CHO a CHL usando las mismas condiciones luego de 24 hs.



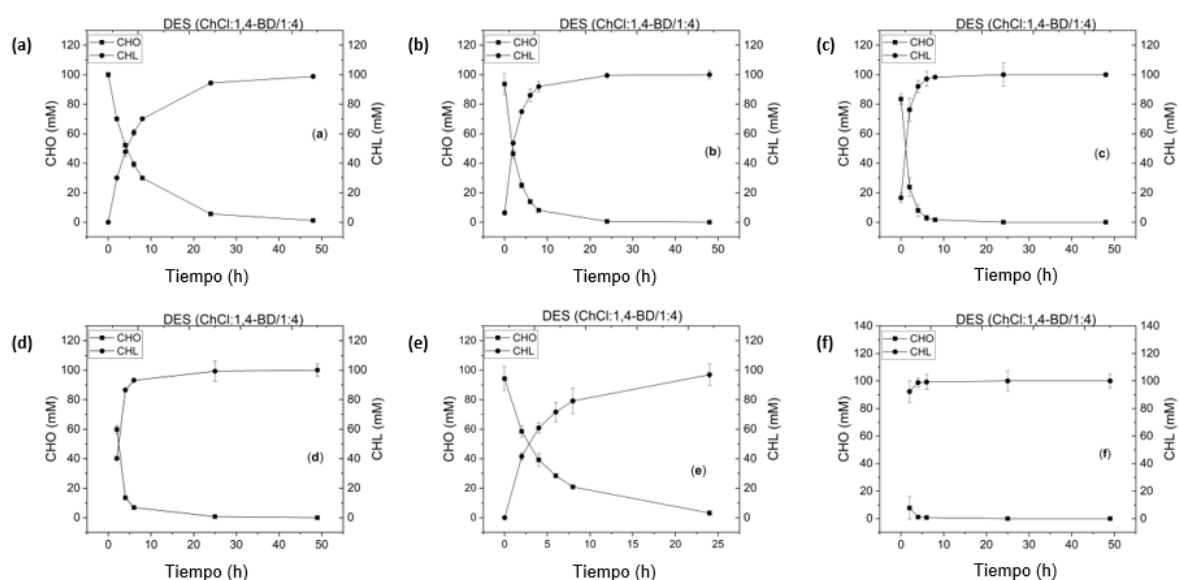
**Figura 5.6.** Progreso de la reacción de reducción de CHO catalizada por HLADH en dos mezclas distintas de DES: (a) DES (ChCl:1,4-BD/1:4); (b) DES (ChCl:1,4-BD/1:5). Condiciones de reacción: 100 mM CHO, 50 mM 1,4-BD, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 1 mg/mL HLADH pura y liofilizada en DES (ChCl:1,4-BD/1:4)-buffer (80:20, v/v), 25°C y 1200 rpm.

Notamos que teníamos un problema con el balance de masa de la reacción, especialmente en aquellas donde se utilizó el DES (ChCl:1,4-BD=1:5). Tras estudiar este inconveniente notamos que la razón por la que se producía esto era debido a que al mezclar el buffer y el DES se produce una contracción de volumen muy grande, lo que conlleva una variación de la concentración de los sustratos si directamente se mezclan todos los componentes de la reacción en el recipiente en el cual ésta se llevaría adelante. En reacciones posteriores, este fenómeno se pudo corregir mezclando primero el buffer y el DES puro, y luego agregando la cantidad deseada del resto de los componentes de reacción.

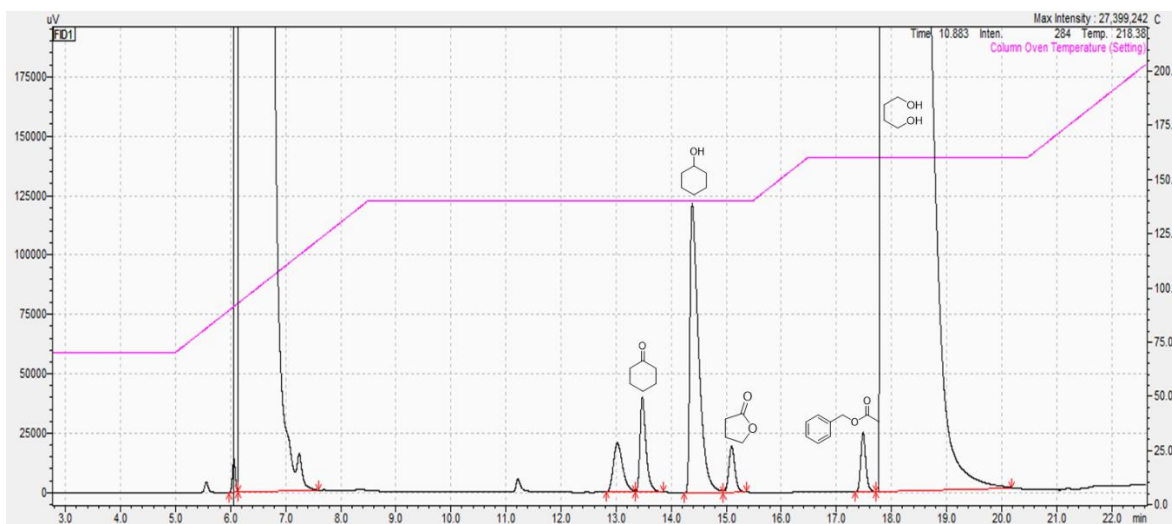


Si bien con ambas mezclas DES/buffer logramos una conversión cuantitativa, con la mezcla DES (ChCl:1,4-BD/1:4)-buffer (80:20, v/v) la cantidad de producto obtenida parecía estabilizarse antes, lo que indicaría que la reacción en este medio es más rápida. Por lo tanto, decidimos llevar a cabo el resto de los estudios con dicho DES.

Una vez que quedó definido el solvente a utilizar, fue necesario determinar la concentración óptima de HLADH. Utilizamos seis concentraciones distintas en el rango de entre 0,05 hasta 2 mg/ml de enzima pura liofilizada, y determinamos la conversión mediante CG-FID. En la figura 5.7 se pueden observar algunos de los perfiles obtenidos, mientras que en la figura 5.8 se muestra un cromatograma como ejemplo.



**Figura 5.7.** Perfiles obtenidos para la reducción de CHO en DES (ChCl:1,4-BD/1:4)-buffer (80:20, v/v) para distintas concentraciones de HLADH: (a) 0.05 mg/mL; (b) 0.1 mg/mL; (c) 0.25 mg/mL; (d) 0.50 mg/mL; (e) 1.00 mg/mL; (f) 2.00 mg/mL. Condiciones de reacción: 100 mM CHO, 50 mM 1,4-BD, 1 mM NAD<sup>+</sup> a 25°C y 1200 rpm.



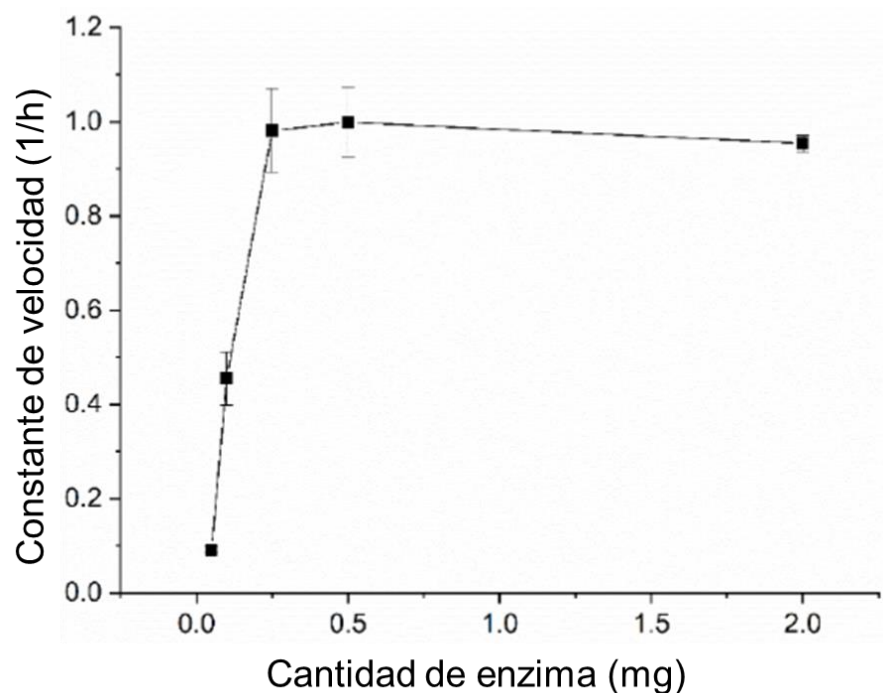
**Figura 5.8.** Ejemplo de uno de los cromatogramas obtenidos. Condiciones de CG detalladas en el capítulo 7. Fe de erratas: la señal a 17,5 min corresponde a benzoato de metilo.

De esta manera, calculando la constante de velocidad de la reacción para cada concentración de HLADH llegamos a las condiciones óptimas para la reducción de CHO en nuestro sistema (Figura 5.9), las cuales se muestran en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Condiciones óptimas para la reducción de CHO en DES catalizada por HLADH.

NAD <sup>+</sup> (mM)	HLADH (mg/ml)	DES -	Temp. (°C)	Agitación (rpm)	% v/v Buffer (Tris-HCl 50mM, pH 7.5)
1	0.25	ChCl:1,4- BD/1:4	25	1200	20

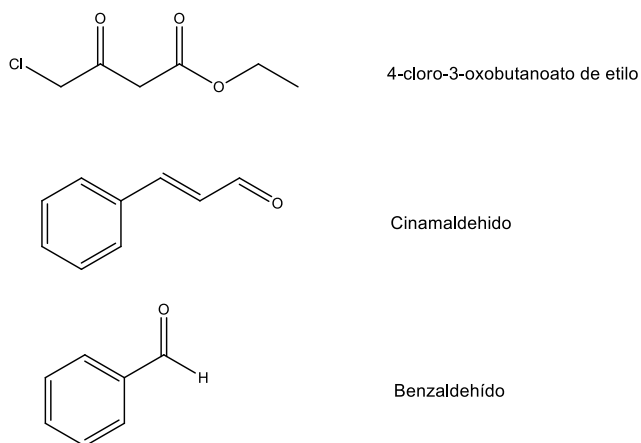
Aplicando las condiciones halladas, logramos la conversión cuantitativa de CHO a CHL luego de 5 hs con una productividad de  $\sim 10 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .



**Figura 5.9.** Relación entre la constante de velocidad y la cantidad de HLADH utilizada.

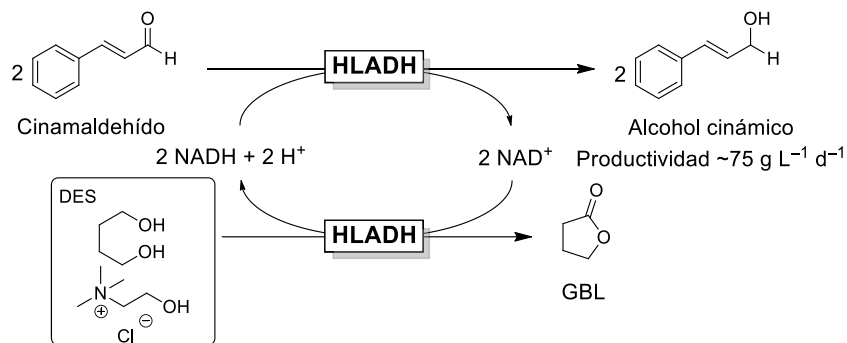
### 5.5. Reducción de otros sustratos

Una vez halladas las condiciones óptimas de reacción, las extrapolamos a la reducción de tres sustratos de interés distintos, con estructuras diversas: benzaldehído, cinamaldehido, y 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo (Figura 5.10.).



**Figura 5.10.** Estructura de sustratos evaluados mediante esta metodología.

Con 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo y benzaldehído no observamos formación de producto tras 48 hs. Con este último sustrato tuvimos problemas con la resolución cromatográfica, por lo que quizás el producto se haya formado, pero no podemos verlo utilizando los métodos de CG evaluados hasta ahora, por lo que es necesario profundizar más en ese camino. Por otro lado, con cinamaldehído obtuvimos una conversión del 25 % tras 48 h de reacción (Figura 5.11.)



**Figura 5.11.** Reducción de cinamaldehído catalizada por HLADH en DES-Buffer (80:20, v/v). DES: ChCl:1,4-BD/1:4.

El alcohol cinámico es un compuesto de un gran interés industrial, siendo sus ésteres muy utilizados como aromatizantes.<sup>32</sup> Dada la inestabilidad tanto del sustrato como del producto obtenido,<sup>33, 34</sup> los sistemas biocatalíticos se presentan como alternativas muy interesantes. Es interesante notar la productividad obtenida con este sistema novedoso, lo cual sugiere que podría aplicarse un sistema continuo de producción de alcohol cinámico usando esta metodología. En este trabajo las condiciones fueron directamente extrapoladas, pero es probable que con un estudio meticuloso del proceso de reacción la productividad sea más elevada, haciendo al sistema aún más eficiente.

## 5.6. Escalado del proceso e inmovilización de HLADH

Una vez que probamos que la estrategia desarrollada podía aplicarse a distintos compuestos carbonílicos, decidimos llevar el proceso a concentraciones más altas de CHO, de 500 mM y 1000 mM. Desafortunadamente, al utilizar estas concentraciones la enzima se vuelve completamente inactiva y no se observa formación de CHL, resultado que puede explicarse considerando la inhibición por sustrato observada en la figura 5.4, y la inhibición provocada por 1,4-BD.<sup>24</sup>

Para superar este desafío, planteamos dos posibles alternativas. Una consistente en llevar adelante una metodología *fed-batch*, añadiendo CHO cada 24 hs hasta llegar a la concentración deseada. Paralelamente, también se inmovilizó la enzima HLADH en el soporte EziG<sup>®</sup>, adaptando protocolos de trabajos anteriores y del manual del producto.<sup>35-37</sup>

Desafortunadamente, al aplicar la metodología mencionada en primer lugar nunca se obtuvieron concentraciones de producto (CHL) mayores a 100 mM.

El soporte EziG<sup>®</sup> contiene átomos de Fe (III) quelados para inmovilizar de forma selectiva enzimas que posean una cola de histidinas, a partir del lisado celular o de un extracto libre de células (CFE por sus siglas en inglés). En este trabajo se utilizó esta última opción. Al unirse directamente a la cola de histidinas se evitan pasos posteriores de purificación, lo cual simplifica el proceso de inmovilización. En nuestro caso particular se mezcló el CFE con las perlas de EziG<sup>®</sup> en un tubo falcon y se agitó suavemente durante 45 minutos. Luego se filtró al vacío, se limpiaron las perlas obtenidas con buffer fosfato y una vez hecho esto se utilizaron.

Estructuralmente, el núcleo de las perlas de EziG<sup>®</sup> está compuesto por un vidrio de porosidad controlada recubierto de un polímero orgánico que puede modificarse para adaptarse a distintos requerimientos. Según el recubrimiento de las perlas hay tres variedades disponibles, tal como se observa en la figura 5.12: Amber (algo hidrofílico), Coral (hidrofílico), y Opal (hidrofóbico).



**Figura 5.12.** Diferentes soportes EziG<sup>®</sup> utilizados en este trabajo de tesis.

Para estudiar los parámetros de inmovilización se midieron la concentración total de proteínas y la actividad tanto en el extracto libre de células original, así como en los sobrenadantes obtenidos luego del proceso de inmovilización, obteniéndose los resultados resumidos en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** *Parámetros de inmovilización de HLADH.*

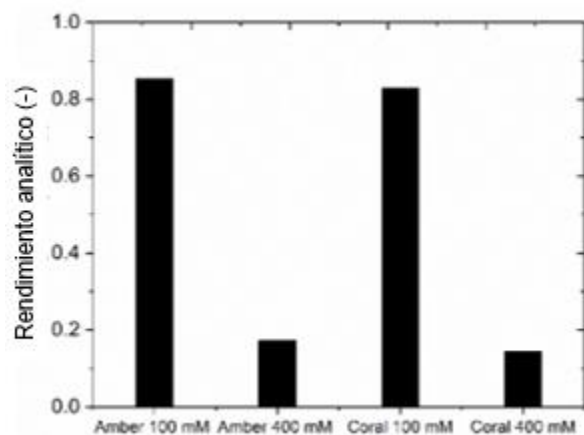
<b>Soporte o CFE</b>	<b>Actividad del sobrenadante (U/ml)</b>	<b>Concentración total de proteínas del sobrenadante (mg/ml)</b>
<b>Amber</b>	4.10	1.17
<b>Coral</b>	5.78	1.06
<b>Opal</b>	4.10	1.60
<b>CFE</b>	7.81	1.55

Determinaciones realizadas espectrofotométricamente según protocolos detallados en el capítulo 7.

Las perlas que mostraron una unión significativa a las proteínas, es decir Amber y Coral, se utilizaron para llevar a cabo reacciones con concentraciones de CHO de 100 mM y 400 mM. Las motivaciones para realizar estos estudios eran, por un lado, evaluar el potencial de esta metodología simple y práctica de inmovilización para HLADH en este tipo de reacciones, y adicionalmente, queríamos averiguar si era posible escalar el sistema a concentraciones mayores a 100 mM de CHO, que hasta aquí era nuestro límite al utilizar la enzima libre.

Luego de 44 hs de reacción los dos soportes utilizados mostraron una conversión significativa y muy similar, tal como puede apreciarse en la figura 5.13, incluso a concentraciones altas de CHO.

Los resultados obtenidos son un avance muy positivo para la aplicación del método descrito en este capítulo a concentraciones altas de CHO. Cabe destacar que al utilizar dichas concentraciones altas, la reacción parece no progresar más luego de 21 hs, probablemente debido a la inactivación de la enzima.



**Figura 5.13.** Rendimiento de la reacción de reducción de CHO catalizada por HLADH inmovilizada en distintos soportes utilizando distintas concentraciones de CHO. Condiciones de reacción: 100 mM o 400 mM CHO, 1 mM NAD<sup>+</sup>, 9.2 mg soporte Amber EziG<sup>®</sup> o 11.3 mg soporte Coral EziG<sup>®</sup> con HLADH inmovilizada en DES (ChCl:1,4-BD/1:4)-H<sub>2</sub>O (80:20, v/v) a 25°C y 1200 rpm.

## 5.7. Conclusiones

En este capítulo se describe por primera vez la aplicación exitosa de un solvente eutéctico profundo (DES) como “co-sustrato inteligente” para la regeneración del cofactor en un ciclo redox, obteniendo resultados muy interesantes para la reducción de distintos compuestos carbonílicos, incluso conversiones cuantitativas cuando las condiciones fueron optimizadas adecuadamente.

La composición del DES utilizado hace que el proceso sea altamente eficiente, ya que el producto secundario formado (GBL) es inerte, lo cual desplaza el equilibrio hacia la formación del alcohol deseado. Es particularmente relevante la síntesis de alcohol cinámico, para la cual se obtuvo una productividad de ~75 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (equivalente a una conversión de ~25 %). En el futuro, para mejorar aún más el proceso descrito en este capítulo podrían optimizarse el medio de reacción para permitir mayores concentraciones de sustrato, la inmovilización de la enzima y podría también plantearse un proceso continuo. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que la utilización de DES como “co-sustratos inteligentes” es altamente prometedora para el desarrollo de procesos químicos sostenibles.

## **Bibliografía**

1. Gorke, J. T.; Srienc, F.; Kazlauskas, R. J., Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chemical Communications* **2008**, (10), 1235-1237.
2. Pätzold, M.; Siebenhaller, S.; Kara, S.; Liese, A.; Syldatk, C.; Holtmann, D., Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis. *Trends in biotechnology* **2019**.
3. Liu, P.; Hao, J.-W.; Mo, L.-P.; Zhang, Z.-H., Recent advances in the application of deep eutectic solvents as sustainable media as well as catalysts in organic reactions. *RSC Advances* **2015**, 5 (60), 48675-48704.
4. Zhao, H.; Zhang, C.; Crittle, T. D., Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, 85, 243-247.
5. Kim, S. H.; Park, S.; Yu, H.; Kim, J. H.; Kim, H. J.; Yang, Y.-H.; Kim, Y. H.; Kim, K. J.; Kan, E.; Lee, S. H., Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, 128, 65-72.
6. Guajardo, N.; Domínguez de María, P.; Ahumada, K.; Schrebler, R. A.; Ramírez-Tagle, R.; Crespo, F. A.; Carlesi, C., Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. *ChemCatChem* **2017**, 9 (8), 1393-1396.
7. Guajardo, N.; Domínguez de María, P., Continuous Biocatalysis in Environmentally-Friendly Media: A Triple Synergy for Future Sustainable Processes. *ChemCatChem* **2019**, 11 (14), 3128-3137.
8. Monti, D.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Riva, S., Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chemical reviews* **2011**, 111 (7), 4111-4140.
9. Brenna, E., *Synthetic Methods for Biologically Active Molecules: Exploring the Potential of Bioreductions*. John Wiley & Sons: 2013.
10. Faber, K.; Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. Springer: 1992; Vol. 4.
11. Hollmann, F.; Arends, I. W.; Holtmann, D., Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chemistry* **2011**, 13 (9), 2285-2314.
12. Younus, H., Oxidoreductases: Overview and Practical Applications. In *Biocatalysis*, Springer: 2019; pp 39-55.
13. Kratzer, R.; Woodley, J. M.; Nidetzky, B., Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD (P) H-dependent, whole cell bioreductions. *Biotechnology advances* **2015**, 33 (8), 1641-1652.
14. Huisman, G. W.; Liang, J.; Krebber, A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Current opinion in chemical biology* **2010**, 14 (2), 122-129.
15. Weckbecker, A.; Gröger, H.; Hummel, W., Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. In *Biosystems Engineering I*, Springer: 2010; pp 195-242.



16. Chenault, H. K.; Whitesides, G. M., Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology* **1987**, *14* (2), 147-197.
17. Wu, H.; Tian, C.; Song, X.; Liu, C.; Yang, D.; Jiang, Z., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes. *Green Chemistry* **2013**, *15* (7), 1773-1789.
18. Hummel, W.; Gröger, H., Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems. *Journal of biotechnology* **2014**, *191*, 22-31.
19. Quinto, T.; Köhler, V.; Ward, T. R., Recent trends in biomimetic NADH regeneration. *Topics in catalysis* **2014**, *57* (5), 321-331.
20. Zachos, I.; Nowak, C.; Sieber, V., Biomimetic cofactors and methods for their recycling. *Current opinion in chemical biology* **2019**, *49*, 59-66.
21. Baer, K.; Krauß, M.; Burda, E.; Hummel, W.; Berkessel, A.; Gröger, H., Sequential and modular synthesis of chiral 1, 3-diols with two stereogenic centers: access to all four stereoisomers by combination of organo- and biocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (49), 9355-9358.
22. Meerwein, H.; Schmidt, R., Ein neues verfahren zur reduktion von aldehyden und ketonen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1925**, *444* (1), 221-238.
23. Ponndorf, W., Der reversible Austausch der Oxydationsstufen zwischen Aldehyden oder Ketonen einerseits und primären oder sekundären Alkoholen andererseits. *Angewandte Chemie* **1926**, *39* (5), 138-143.
24. Kara, S.; Spickermann, D.; Schrittwieser, J. H.; Leggewie, C.; van Berkel, W. J.; Arends, I. W.; Hollmann, F., More efficient redox biocatalysis by utilising 1, 4-butanediol as a 'smart cosubstrate'. *Green Chemistry* **2013**, *15* (2), 330-335.
25. Lavandera, I.; Kern, A.; Resch, V.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; Fabian, W. M.; de Wildeman, S.; Kroutil, W., One-way biohydrogen transfer for oxidation of sec-alcohols. *Organic letters* **2008**, *10* (11), 2155-2158.
26. Kara, S.; Spickermann, D.; Weckbecker, A.; Leggewie, C.; Arends, I. W.; Hollmann, F., Bioreductions catalyzed by an alcohol dehydrogenase in non-aqueous media. *ChemCatChem* **2014**, *6* (4), 973-976.
27. Mourelle-Insua, Á.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V., A designer natural deep eutectic solvent to recycle the cofactor in alcohol dehydrogenase-catalysed processes. *Green Chemistry* **2019**, *21* (11), 2946-2951.
28. Irwin, A. J.; Jones, J. B., Asymmetric syntheses via enantiotopically selective horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of diols containing a prochiral center. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99* (2), 556-561.
29. Jakovac, I. J.; Goodbrand, H. B.; Lok, K. P.; Jones, J. B., Enzymes in organic synthesis. 24. Preparations of enantiomerically pure chiral lactones via stereospecific horse liver alcohol

dehydrogenase catalyzed oxidations of monocyclic meso diols. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104* (17), 4659-4665.

30. Lok, K. P.; Jakovac, I. J.; Jones, J. B., Enzymes in organic synthesis. 34. Preparations of enantiomerically pure exo-and endo-bridged bicyclic [2.2. 1] and [2.2. 2] chiral lactones via stereospecific horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of meso diols. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107* (8), 2521-2526.

31. Kara, S.; Spickermann, D.; Schrittwieser, J. H.; Weckbecker, A.; Leggewie, C.; Arends, I. W.; Hollmann, F., Access to lactone building blocks via horse liver alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidative lactonization. *Acs Catalysis* **2013**, *3* (11), 2436-2439.

32. Klumbys, E.; Zebec, Z.; Weise, N. J.; Turner, N. J.; Scrutton, N. S., Bio-derived Production of Cinnamyl Alcohol via a Three Step Biocatalytic Cascade and Metabolic Engineering. *Green Chem* **2019**, *20* (3), 658-663.

33. Chamouleau, F.; Hagedorn, C.; May, O.; Gröger, H., Biocatalytic aldehyde reduction using tailor-made whole-cell catalysts: a novel synthesis of the aroma chemical cinnamyl alcohol. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**, *22* (3), 169-172.

34. Pennacchio, A.; Rossi, M.; Raia, C. A., Synthesis of Cinnamyl Alcohol from Cinnamaldehyde with *Bacillus stearothermophilus* Alcohol Dehydrogenase as the Isolated Enzyme and in Recombinant *E. coli* Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *170* (6), 1482-1490.

35. Thompson, M. P.; Derrington, S. R.; Heath, R. S.; Porter, J. L.; Mangas-Sanchez, J.; Devine, P. N.; Truppo, M. D.; Turner, N. J., A generic platform for the immobilisation of engineered biocatalysts. *Tetrahedron* **2019**, *75* (3), 327-334.

36. Cassimjee, K. E.; Kadow, M.; Wikmark, Y.; Humble, M. S.; Rothstein, M.; Rothstein, D.; Bäckvall, J.-E., A general protein purification and immobilization method on controlled porosity glass: biocatalytic applications. *Chemical Communications* **2014**, *50* (65), 9134-9137.

37. Böhmer, W.; Knaus, T.; Mutti, F. G., Hydrogen-Borrowing Alcohol Bioamination with Coimmobilized Dehydrogenases. *ChemCatChem* **2018**, *10* (4), 731-735.

# CAPÍTULO 6

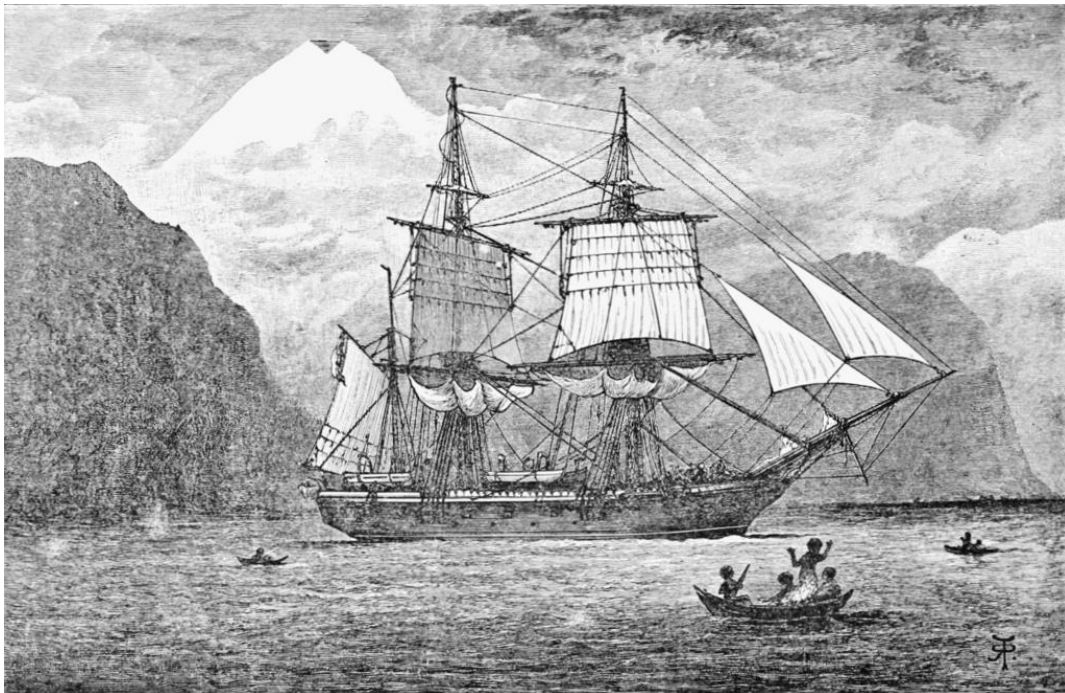
## ***Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria***

*...de que en realidad la idea de todo esto...*

## 6. Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria

### 6.1. Introducción

La tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las trece enfermedades tropicales más desatendidas.<sup>1</sup> Es una parasitosis crónica provocada por el kinetoplástido *Trypanosoma cruzi* que ha afectado a los pobladores del Nuevo Mundo desde los tiempos en que los primeros asentamientos americanos fueron construidos hace alrededor de 9000 años.<sup>2</sup> Sin embargo, recién a principios del siglo pasado comenzó a comprenderse mejor la naturaleza de esta enfermedad infecciosa gracias a los trabajos del infectólogo brasileño Carlos Chagas,<sup>3</sup> posteriormente ampliados y perfeccionados por Salvador Mazza en nuestro país.<sup>4</sup> Curiosamente, es probable que Charles Darwin haya contraído la enfermedad durante su expedición por Sudamérica a bordo del HMS *Beagle* en 1835 (figura 6.1), como sugiere la vívida descripción de su diario de viaje de un contacto con triatominos, los principales vectores de la enfermedad, y también síntomas presentados por él a lo largo de su vida.<sup>5, 6</sup>



**Figura 6.1.** Imagen del HMS *Beagle* en el estrecho de Magallanes, con el Monte Sarmiento (Chile) de fondo. Ilustración de Robert Pritchett para la revista *The Popular Science Monthly*, mayo de 1900.

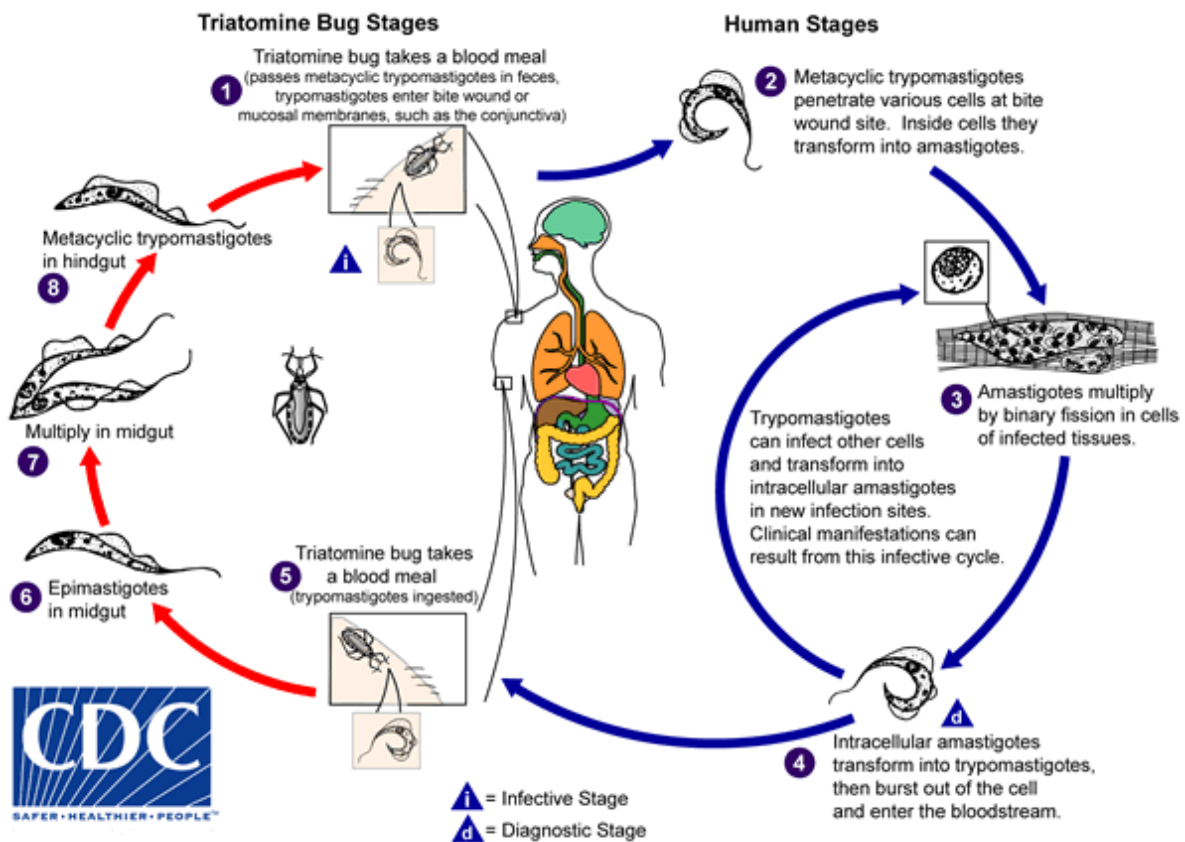
La enfermedad de Chagas se transmite tanto a humanos como a un gran número de especies animales a través de insectos de la subfamilia Triatominae. Aunque se conocen más de 130 especies de estos insectos, sólo unas pocas son vectores competentes para *T. cruzi*,<sup>7, 8</sup> siendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* los tres vectores más importantes en la transmisión del parásito a humanos. Esta enfermedad es endémica desde México hasta Argentina, e históricamente *T. infestans* (figura 6.2) es con gran diferencia el vector más importante en las regiones sub-amazónicas, *R. prolixus* es típicamente el más reportado en el norte de Sudamérica y Centroamérica, mientras que *T. dimidiata* es el vector más común en la zona de México.

Las formas de transmisión no-vectoriales incluyen transfusiones sanguíneas, ingestión de comida contaminada con el parásito o transmisión vertical, de la madre al hijo.<sup>9</sup>



**Figura 6.2.** *Triatoma infestans*, el principal vector del mal de Chagas en los países del sur de Sudamérica. Fotografía: J. Postigo, Lycée de Recherche pour le Développement.<sup>10</sup>

En todas las formas de transmisión, la forma tripomastigote del parásito, que es infectiva pero no proliferativa, entra al flujo sanguíneo y logra evadir al sistema inmune del hospedador al invadir una variedad de células diferentes, incluyendo células musculares y nerviosas del corazón y del tracto gastrointestinal, así como aquellas del sistema fagocítico mononuclear. Luego de la invasión, los parásitos se diferencian a amastigotes, que proliferan en el citoplasma mediante fisión binaria y eventualmente se rediferencian a tripomastigotes, que normalmente destruyen la célula hospedadora y vuelven al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes así invaden otros tejidos, a la vez que también pueden ser ingeridos por un triatomino vector que se alimente de esta sangre infectada. En el tracto gastrointestinal del insecto los parásitos se diferencian a epimastigotes no infecciosos, que proliferan rápidamente y vuelven a transformarse en tripomastigotes, cerrando así el ciclo detallado en la figura 6.3.



**Figura 6.3.** Ciclo de vida del parásito *T. cruzi*. Imagen: Centers for Disease Control and Prevention.

El daño en los tejidos de los mamíferos hospedadores es consecuencia tanto de la acción directa del parásito como de la respuesta inflamatoria que provoca.<sup>11</sup> La fase aguda de la enfermedad tiene

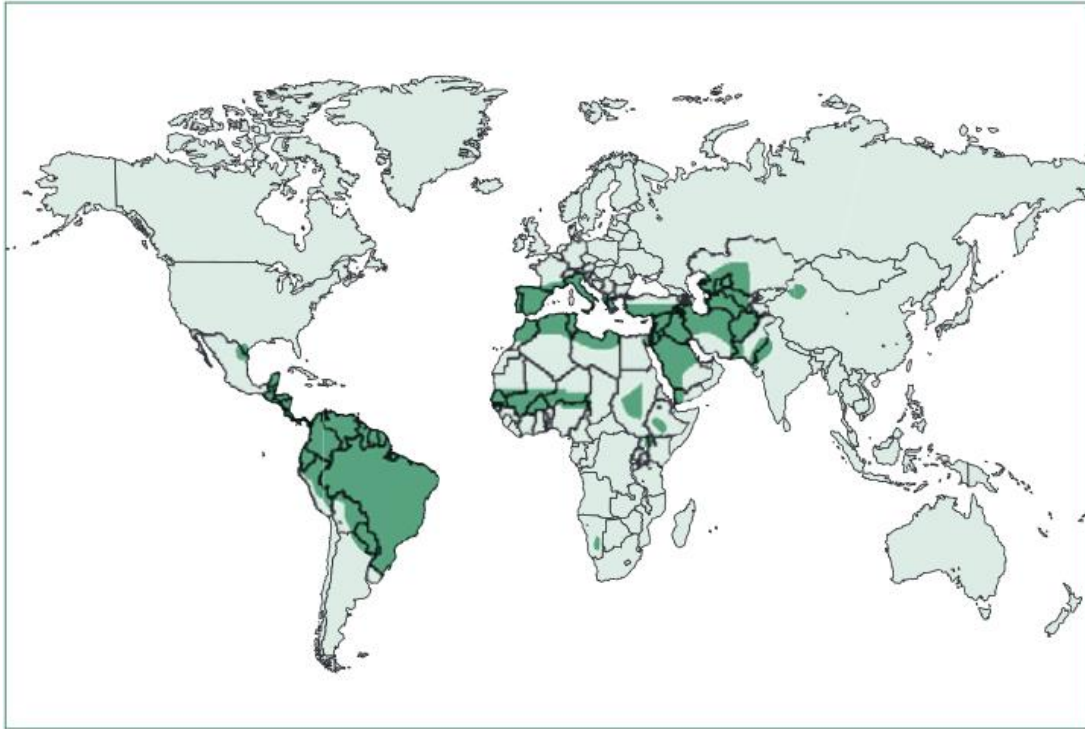
una mortalidad relativamente baja, menor al diez por ciento de los casos, y generalmente presenta síntomas leves e inespecíficos, aunque en el caso de transmisión provocada por un vector puede observarse una herida característica por donde ingresó el parásito a través de la piel, denominada chagoma, o si el ingreso fue a través de las mucosas oculares una inflamación denominada signo de Romaña. Tras la fase aguda se presenta una condición crónica, donde la respuesta inmune del hospedador limita la proliferación del parásito, pero es incapaz de eliminarlo. Esto lleva a una respuesta inflamatoria sostenida que provoca al menos una de las formas crónicas sintomáticas de la enfermedad en el 30-40 % de los pacientes, incluyendo la cardiomiopatía crónica provocada por Enfermedad de Chagas (CCC), problemas digestivos y neuropatías.<sup>12</sup> La más severa de estas manifestaciones es la CCC, que típicamente se presenta varias décadas después de la infección, y es la causa principal de enfermedades y muertes por problemas cardíacos en zonas rurales de bajos ingresos en Latinoamérica.<sup>13-15</sup>

Las condiciones socioeconómicas de la población juegan un rol preponderante en la propagación de la enfermedad. Por lo tanto, las tareas de prevención requieren un enfoque integral, que atiendan las causas sociales que se encuentran detrás de esta dolencia que, según datos de la OMS, actualmente afecta a más de 7 millones de personas, principalmente en Latinoamérica.

Otra enfermedad desatendida es la leishmaniasis, una dolencia que presenta tres formas: visceral, cutánea y mucocutánea. Es endémica en más de 70 países y se encuentra presente en todos los continentes excepto Oceanía, tal como se ve en la figura 6.4, y es provocada por los parásitos del género *Leishmania*, que parasitan las células del sistema reticuloendotelial.

La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más importantes y representa un serio problema sanitario a nivel mundial. Es una dolencia conocida en el Viejo Mundo desde tiempos inmemoriales, habiéndose encontrado descripciones de las lesiones en tabletas del siglo VII a.C., encontradas en la librería del rey Asurbanipal, el último gran rey de Asiria.<sup>17</sup> En América, las graves lesiones provocadas por la leishmaniasis fueron descritas en esculturas desde el siglo V d.C, así como también, mucho después, por escritos de misionarios españoles del siglo XVI.<sup>18</sup>

Los parásitos del género *Leishmania* pueden transmitirse a humanos y otros mamíferos a través de moscas de los géneros *Phlebotomus* (en Eurasia y África) y *Lutzomyia* (en América).<sup>16</sup> Globalmente, y según datos de la OMS, se estima que cada año se producen entre 700000 y un millón de nuevos casos y entre 26000 y 65000 defunciones, mientras que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. En Latinoamérica en particular, se estiman alrededor de 60000 nuevos casos por año, incluyendo todos los tipos de leishmaniasis.<sup>19</sup> Las diferentes leishmaniasis se caracterizan por presentar un espectro de síntomas clínicos, que oscilan desde pequeños nódulos cutáneos hasta la destrucción generalizada de los tejidos mucosos y complicaciones hepáticas. La transmisión no mediada por vectores es rara.



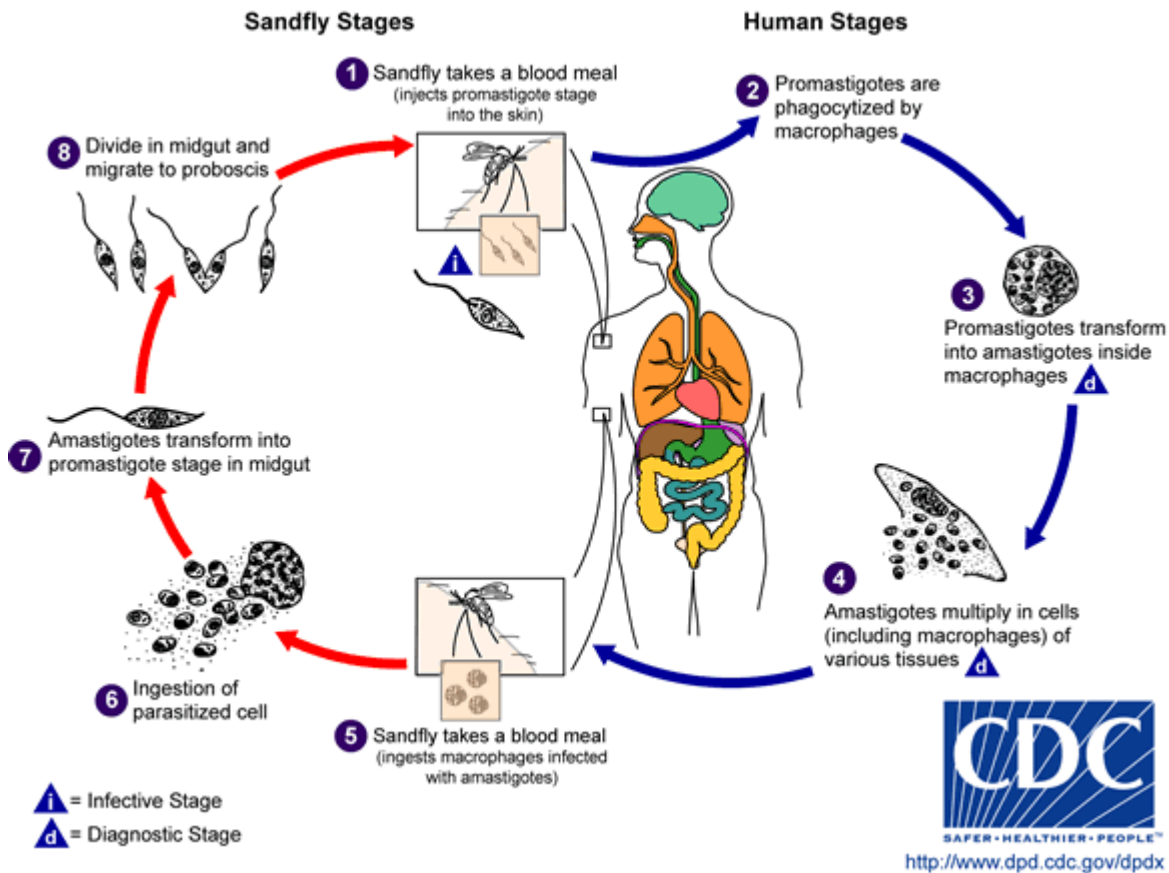
**Figura 6.4.** Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea. Imagen adaptada de Reithlinger et al.<sup>16</sup>

Del mismo modo que con la enfermedad de Chagas, las condiciones socio-económicas tienen un rol preponderante en la expansión de la enfermedad. En ese sentido, el caso de Afganistán es particularmente ilustrativo. En la capital de ese país, Kabul, antes de 1990 prácticamente no se reportaban casos. Sin embargo, para el año 2003 ya se habían documentado 25000 casos. Nuevos datos indican que este número ha escalado hasta 67500 nuevos casos por año.<sup>20</sup>

El ciclo de vida de los parásitos *Leishmania* se muestra en la figura 6.5, donde se observa que la hembra del hematófago ingiere macrófagos infectados con la forma amastigote del parásito del organismo reservorio. En el tracto digestivo del insecto, el parásito comienza un proceso de transformación en el cual se transforma a la forma promastigote, que es infectiva, e ingresa a un nuevo huésped sano al ser regurgitado por el hematófago. Luego de esto, el parásito es fagocitado por macrófagos locales y células epidermales de Langerhans, generando síntomas cutáneos locales. El parásito se transforma a la forma amastigote dentro de los macrófagos del hospedador y luego se multiplica y vuelve a ser ingerido en esta forma por el vector, cerrando así el ciclo.

El desarrollo de la infección y el cuadro clínico dependen del tipo de parásito, del huésped y del vector; dosis o ruta de inoculación; así como también de que los macrófagos se mantengan en un estado inerte.<sup>21</sup>



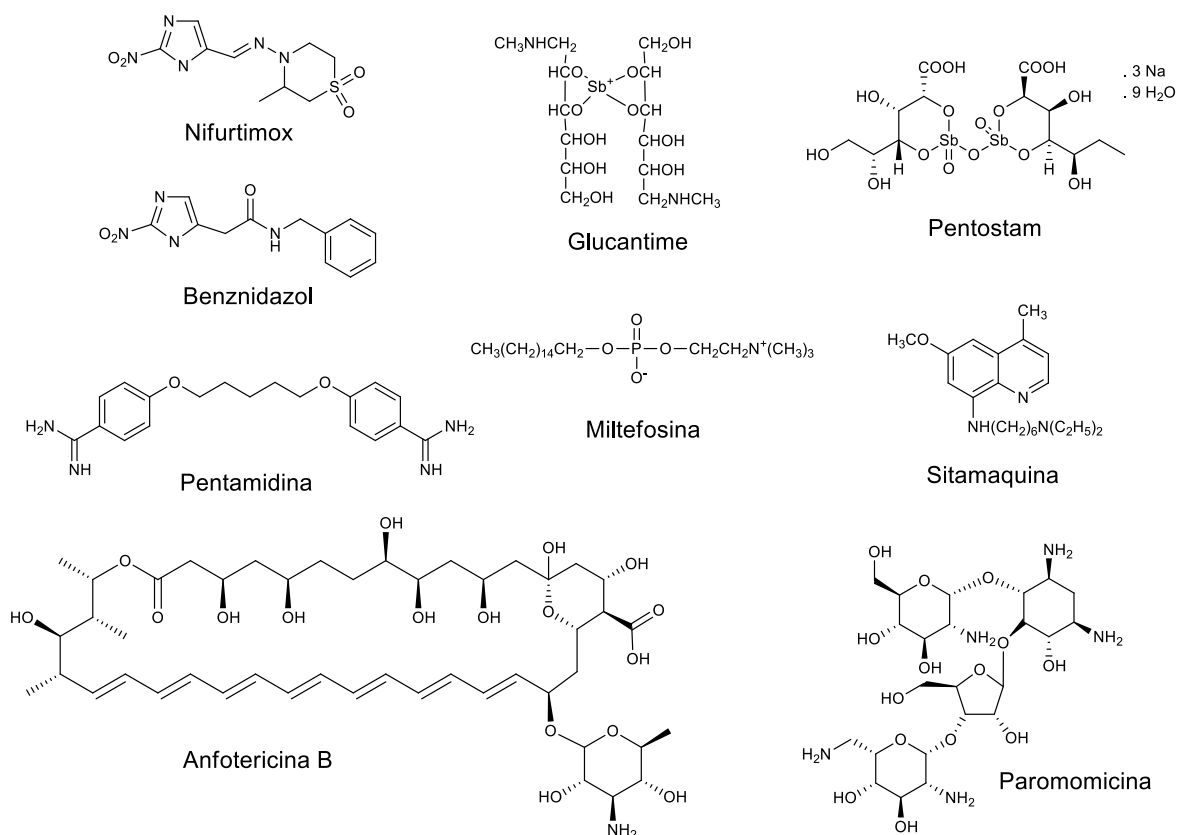


**Figura 6.5.** Ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania*. Imagen: Centers for Disease Control and Prevention.

Los tratamientos actuales tanto para la enfermedad de Chagas como para los distintos tipos de leishmaniasis continúan siendo deficientes. En el primer caso, la terapia se basa en compuestos nitroheterocíclicos, principalmente dos drogas descubiertas empíricamente, nifurtimox y benznidazol (Bnz). Si bien ambos compuestos pueden curar por lo menos el 50 % de las infecciones recientes, presentan severos efectos adversos al ser utilizados en la fase crónica, tales como anorexia, pérdida de peso, alteraciones psiquiátricas, excitabilidad, somnolencia, problemas digestivos y diarrea en el caso de nifurtimox, así como problemas cutáneos, mielosupresión, trombocitopenia y granulopenia si se utiliza benznidazol.<sup>22, 23</sup>

La terapia para el tratamiento de la leishmaniasis se basó durante más de sesenta años en el uso de drogas de antimonio pentavalente, siendo el antimoniato de meglumina (Glucantime) o el estibogluconato de sodio (Pentostam) las más usadas.<sup>24</sup> Sin embargo, estas drogas también presentan efectos adversos graves y altas tasas de resistencia en varios lugares del mundo.<sup>25, 26</sup> Otras drogas utilizadas cuando los compuestos de antimonio no son efectivos incluyen pentamidina

y anfotericina B. Estas drogas también tienen varias desventajas, asociadas a su alto precio, a la necesidad de realizar tratamientos largos, la pérdida de efectividad debido al desarrollo de resistencia y también presentan graves efectos adversos.<sup>27</sup> Por otro lado, recientemente se aprobó la droga llamada miltefosina para el tratamiento de infecciones por leishmaniasis visceral en humanos,<sup>28, 29</sup> pero lamentablemente se piensa que dicha droga podría ser teratogénica.<sup>30, 31</sup> La sitamaquina y el antibiótico paromomicina son otras dos drogas muy interesantes que se encuentran en etapa de investigación para el tratamiento de esta enfermedad.<sup>32-34</sup> Las estructuras de todos los compuestos mencionados se detallan en la figura 6.6.



**Figura 6.6.** Drogas comúnmente utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y leishmaniasis.

A pesar de los grandes esfuerzos y de los numerosos estudios que se han llevado a cabo en los últimos años, los problemas de resistencia a las drogas y los graves efectos adversos provocados por éstas no han sido resueltos. Por lo tanto, es imprescindible el desarrollo de drogas novedosas que sean seguras y accesibles, así como de gran potencia y actividad antiparasitaria.<sup>35</sup> En ese sentido los derivados de quinolina, principalmente reportados como agentes antimaláricos,

mostraron actividad frente a parásitos del género *Leishmania*, así como también frente a tripanosomas, bacterias y ciertos tumores.<sup>36</sup> La cloroquina (CQ), que es una de las drogas antimaláricas más exitosas,<sup>37</sup> mostró actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, y es utilizada también para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.<sup>38-41</sup> Algunas quinolinas sustituidas en la posición 2 demostraron ser efectivas para el tratamiento de leishmaniasis cutánea así como también en ratones infectados con *T. cruzi*.<sup>42, 43</sup> El tipifarnib, otro derivado de quinolina que es utilizado en el tratamiento del cáncer, también mostró actividad antiparasitaria.<sup>44-46</sup>

Si bien el mecanismo de acción de CQ, así como el de otras aminoquinolinas usadas como antimaláricos, no ha sido completamente elucidado aún, se piensa que involucra una interacción con el grupo hemo, inhibiendo su polimerización a hemozoína.<sup>47-51</sup> Este último es un producto no tóxico de la digestión del hemo por los parásitos, sin las propiedades pro oxidantes de éste; así, la acumulación de hemo libre llevaría a la muerte del parásito.

## **6.2. Resultados y discusión**

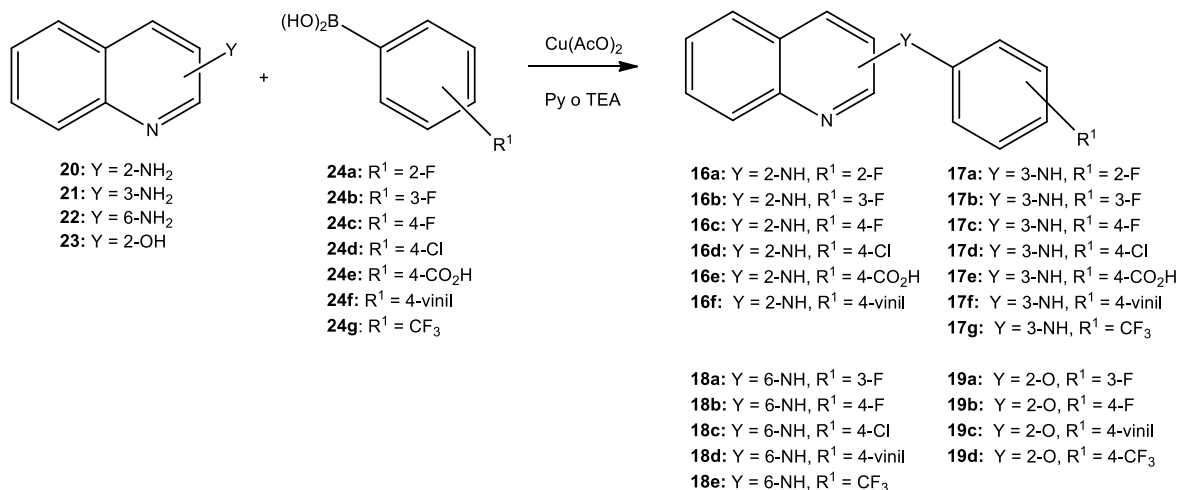
En este capítulo se detalla la síntesis de una serie de derivados de 2-, 3- y 6-arilaminoquinolinas, así como también de 2-hidroxiquinolina, varios de ellos compuestos nuevos, muchos de los cuales se evaluaron biológicamente frente a *T. cruzi* y *L. mexicana*. También se estudió el posible mecanismo de acción antiparasitario.

## **6.3. Síntesis de arilaminoquinolinas y de ariloxiquinolinas**

Es un hecho conocido que un gran número de compuestos biológicamente activos contienen un anillo aromático heterocíclico en su estructura.<sup>52-58</sup> En particular, los derivados de quinolina mostraron actividad antibacteriana, antiinflamatoria y antiparasitaria.<sup>59-63</sup> Además, siguiendo la línea de trabajo de nuestro laboratorio, según la cual reportamos la síntesis de varios compuestos nitrogenados bioactivos,<sup>64, 65</sup> en este caso buscamos preparar diferentes productos trabajando sobre el anillo de quinolina.

Se sintetizaron veinticuatro compuestos derivados de 2-, 3- y 6-aminoquinolina, y de 2-hidroxiquinolina considerando principios de la química medicinal tales como la transformación sobre el anillo o la inclusión de grupos adecuados. Por ejemplo, la sustitución sobre el arilo mediante la introducción de halógenos, un grupo ácido o una cadena insaturada podría incrementar la potencia y mejorar la estabilidad metabólica.

Dichos derivados se prepararon mediante una reacción de acoplamiento que involucra un ácido arilborónico y una amina o alcohol aromático adecuado, tal como se muestra en la figura 6.7.



**Figura 6.7.** Estrategia sintética para la preparación de los derivados de quinolina obtenidos.

Los ácidos borónicos son reactivos ampliamente utilizados para la formación de enlaces carbono-heteroátomo. De forma análoga, los ácidos fenilborónicos son eficientes agentes arilantes. Esta metodología de *N*-arilación puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves a temperatura ambiente, en presencia de piridina y acetato cúprico como catalizadores. En otros trabajos se ha observado que el rendimiento de esta reacción es altamente dependiente de la naturaleza del sustrato y de la sustitución del ácido borónico.<sup>66-68</sup>

Partiendo de quinolinas sustituidas comerciales (**20-23**), se realizó la reacción de acoplamiento con varios ácidos fenilborónicos sustituidos (**24a-24g**) en diclorometano seco. Los derivados obtenidos (**16a-19d**) se sintetizaron con rendimientos de buenos a muy buenos, tal como se detalla en la tabla 6.1.

Como puede observarse en la tabla, los rendimientos se ven afectados por la naturaleza de los sustratos. Los rendimientos obtenidos utilizando 3-aminoquinolina como sustrato, son por lo general mejores que cuando se utiliza 2-aminoquinolina, 6-aminoquinolina, o 2-hidroxiquinolina. A su vez, los rendimientos fueron más altos cuando el sustituyente era un halógeno, principalmente en la posición 4 del grupo fenilo. Todos los compuestos obtenidos se caracterizaron completamente mediante <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN, HRMS e IR.

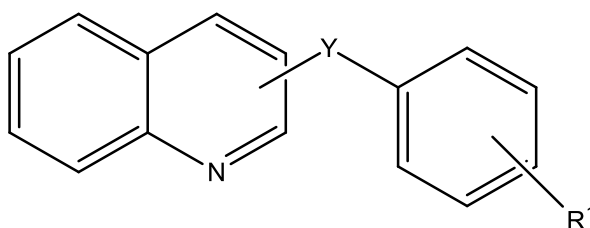
**Tabla 6.1.** Rendimiento de la síntesis de derivados de quinolinas sustituidas.

R <sup>1</sup>	Rendimiento (%) 2- arilaminoquinolina	Rendimiento (%) 3- arilaminoquinolina	Rendimiento (%) 6- arilaminoquinolina	Rendimiento (%) 2- ariloxiquinolona
2-F	66	70	-	-
3-F	70	80	72	66
4-F	75	85	75	69
4-Cl	72	82	71	-
4-CO <sub>2</sub> H	45	50	-	-
4-CH <sub>2</sub> =CH <sub>2</sub>	68	75	70	69
4-CF <sub>3</sub>	-	64	65	71

Además, siguiendo la misma metodología se buscó también obtener derivados de 8-hidroxiquinolina. Lamentablemente, con este sustrato no obtuvimos resultados exitosos, probablemente debido a su capacidad quelante.

#### 6.4. Evaluación biológica

En colaboración con los grupos de los Dres. Carlos Labriola y Elisa Lombardo, los productos detallados en la figura 6.8 se evaluaron frente a *T. cruzi* y *L. mexicana*.



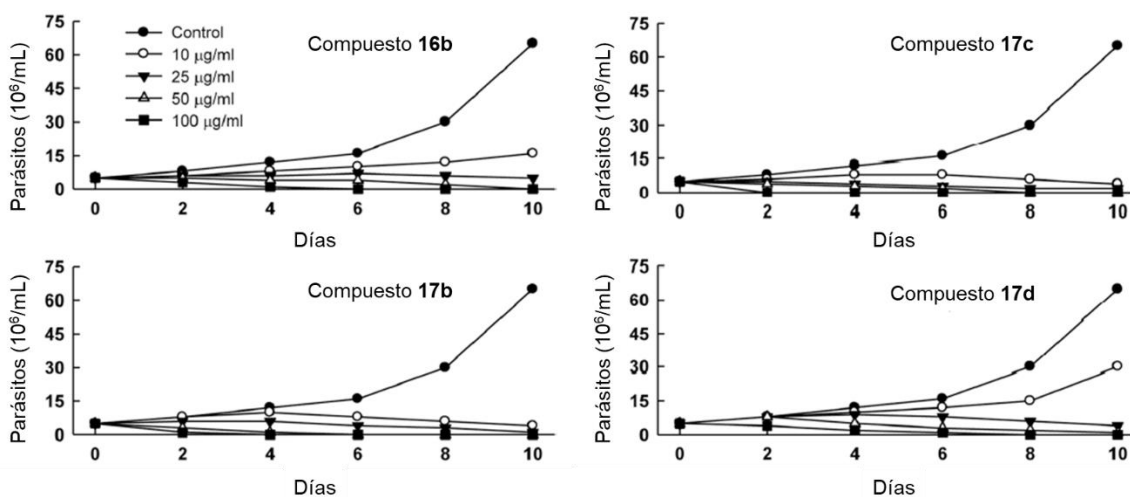
**16a-f:** Y = 2-NH, R<sup>1</sup> = 2-F, 3-F, 4-F, 4-Cl, 4-CO<sub>2</sub>H, 4-vinil

**17a-f:** Y = 3-NH, R<sup>1</sup> = 2-F, 3-F, 4-F, 4-Cl, 4-CO<sub>2</sub>H, 4-vinil

**Figura 6.8.** Estructuras de los derivados de 2- y 3-arilaminoquinolina evaluados como agentes antiparasitarios.

## 6.5. Actividad anti *Leishmania mexicana*

Se estudió durante diez días el efecto de diferentes concentraciones de varias 2- y 3- arilaminoquinolinas (**16 a-f** y **17 a-f**) en el crecimiento de la forma promastigote de *Leishmania mexicana*. Se utilizó geneticina, un conocido agente antiparasitario, como inhibidor estándar a una concentración de 50 µg/mL. Se observó un significativo efecto inhibitorio en el crecimiento de *L. mexicana* con los compuestos **16b**, **17b**, **17c** y **17d**. El resto de los compuestos evaluados fueron activos, pero a concentraciones mayores que 50 µg/mL. Para la dosis más baja, que fue de 10 µg/mL, se detectó una inhibición del 50% luego de seis días de incubación para **17b** y **17c**. Con 25 µg/mL, se observó una inhibición de 25% y 37,5% respectivamente luego de dos días, alcanzando un máximo de 100% luego de 10 días de exposición para ambos compuestos. En la figura 6.9 se muestran las curvas de crecimiento de la forma promastigote de *L. mexicana* en presencia de **16b**, **17b**, **17c** y **17d**.



**Figura 6.9.** Efecto de **16b**, **17b**, **17c** y **17d** a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Leishmania mexicana*. Los promastigotes se cultivaron a 28 °C durante 10 días en presencia de distintas concentraciones de los compuestos evaluados (10-100 µg/ml). La inhibición del crecimiento se estimó contando los parásitos cada dos días usando una cámara Neubauer. Los *p*-valores < 0,05 (\*) y < 0,01 (\*\*) fueron considerados significativos.

Estos cuatro compuestos fueron los más potentes frente a *L. mexicana* con valores de IC<sub>50</sub> de 75,6, 41,9, 41,9 y 98,1 µM (sexto día de crecimiento) para **16b**, **17b**, **17c** y **17d** respectivamente, mostrando así mejor actividad que el inhibidor utilizado como control (IC<sub>50</sub> 100 µM). En la tabla 6.2 se detallan los resultados obtenidos para todos los derivados ensayados.

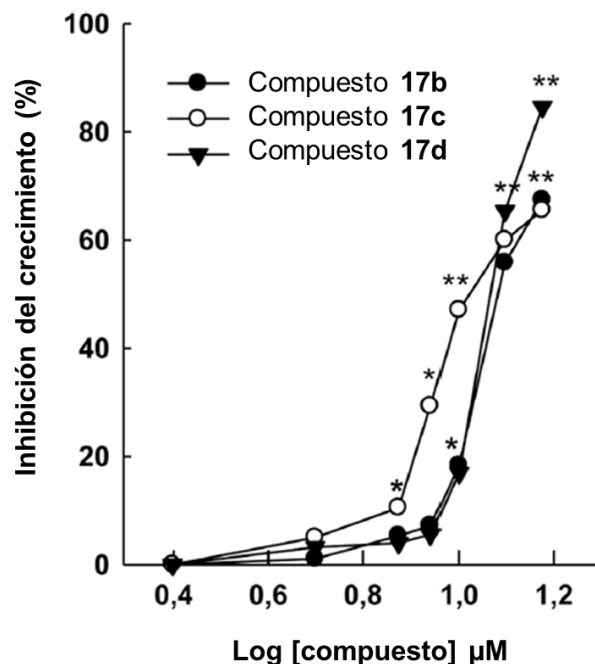
Los productos fluorados **16b**, **17b** y **17c** fueron los más potentes, indicando que la presencia del átomo de flúor incrementa la actividad inhibitoria. Adicionalmente, notamos que el compuesto más potente es el derivado de 3-aminoquinolina que contiene un átomo de flúor en la posición 4 (**17c**). La presencia de dicho átomo podría mejorar el valor de logP, mejorando la penetración transmembrana al tener un mejor coeficiente de reparto octanol/agua, resultando en una actividad biológica superior.<sup>69</sup> La sustitución con un átomo de cloro en la posición 4 del grupo fenilo (**17d**) dio como resultado un compuesto con una actividad similar a la genenticina.

### 6.6. Actividad anti *Trypanosoma cruzi*

Inicialmente, los compuestos **16a-f** y **17a-f** se evaluaron como inhibidores de crecimiento de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, utilizando concentraciones desde 2,5  $\mu\text{M}$  hasta 15  $\mu\text{M}$  en tres ensayos independientes. Se utilizó benznidazol, una de las drogas más comunes para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, como control positivo. Los derivados de 3-aminoquinolina que contenían un halógeno (**17b-d**) fueron nuevamente los más potentes, mostrando un efecto inhibitorio del mismo orden que benznidazol. El resto de los compuestos evaluados resultaron inactivos hasta una concentración de 15  $\mu\text{M}$ . En la figura 6.10 se muestran las curvas de crecimiento a partir de las cuales se calculó el  $\text{IC}_{50}$  para los compuestos **17b**, **17c** y **17d**, cuyos valores son 13,5, 11,3 y 12  $\mu\text{M}$  respectivamente. En la tabla 6.2 se detallan los resultados obtenidos para todos los compuestos evaluados.

El promisorio hallazgo de la actividad de los compuestos **17b**, **17c** y **17d** contra *T. cruzi* nos impulsó a estudiar su actividad contra la forma tripomastigote, que se encuentra en el flujo sanguíneo, y también contra la forma amastigote, que es intracelular. Al hacerlo, notamos que dichos compuestos también son los que tienen la mejor actividad antiparasitaria en las formas tripomastigote y amastigote (Tabla 6.2).

Con estos resultados, podemos concluir que los compuestos **17b-d** son los que tienen mejor actividad antiparasitaria tanto sobre *L. mexicana*, como sobre *T. cruzi*. Adicionalmente, es importante resaltar que el compuesto **17c** presentó un valor de  $\text{IC}_{50}$  del mismo orden que el benznidazol.



**Figura 6.10.** Efecto de la concentración de **17b**, **17c** y **17d** en la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Los parásitos se cultivaron a 28 °C durante 4 días en presencia de distintas concentraciones de los compuestos evaluados (2,5-15  $\mu\text{M/ml}$ ). La inhibición del crecimiento se estimó contando los parásitos usando una cámara Neubauer. Los p-valores < 0,05 (\*) y < 0,01 (\*\*) fueron considerados significativos.

### 6.7.Citotoxicidad

También se determinó la actividad citotóxica de los compuestos **16 a-f** y **17 a-f**. Los resultados se encuentran detallados en la tabla 6.2. Puede verse en dicha tabla que, para concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$ , no se observó un efecto citotóxico para los compuestos **17b**, **17c** y **17c**, mientras que para benznidazol es de  $85 \pm 5 \mu\text{M}$ .



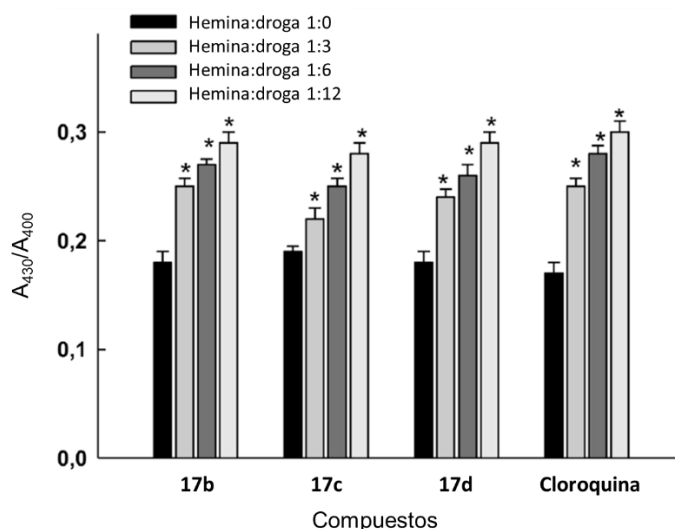
**Tabla 6.2.** Actividad biológica de los derivados de quinolina evaluados frente a *T. cruzi* (formas epi-, tripo-, y amastigote) y frente a *L. mexicana* (forma promastigote).

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)				Citotoxicidad
	<i>Lm pro</i>	<i>Tc epi</i>	<i>Tc tripo</i>	<i>Tc amas</i>	CC <sub>50</sub> (μM)
<b>16a</b>	>200	>15	≫500	≫50	>100
<b>16b</b>	75,6 ± 1,0	>15	811,02±19,35	58,4 ± 0,8	>100
<b>16c</b>	>200	>15	≫500	≫50	>100
<b>16d</b>	>200	>15	≫500	≫50	185 ± 3
<b>16e</b>	>200	≫15	≫500	≫50	ND
<b>16f</b>	>200	≫15	≫500	≫50	ND
<b>17a</b>	>200	>15	≫500	≫50	ND
<b>17b</b>	41,9 ± 1,0	13,51 ± 1,20	419,95±12,24	22,8 ± 0,9	>100
<b>17c</b>	41,9 ± 0,8	11,29 ± 0,63	616,02±15,80	10,9 ± 1,2	≫100
<b>17d</b>	98,1 ± 1,6	12,01 ± 0,18	≫500	25,8 ± 3,0	>100
<b>17e</b>	>200	≫15	≫500	≫50	ND
<b>17f</b>	>200	≫15	≫500	≫50	ND
<b>Bnz</b>	-	7,56 ± 0,50	38,43 ± 4,20	4,88 ± 0,60	85 ± 5
<b>Geneticina</b>	100	-	-	-	-

Los valores de IC<sub>50</sub> se determinaron mediante una regresión no-lineal a partir del porcentaje de inhibición del crecimiento parasitario y el logaritmo de la concentración de droga. Los valores de CC<sub>50</sub> se calcularon en células Vero mediante una regresión no-lineal a partir del porcentaje de células viables y el logaritmo de la concentración de droga. ND: no determinado.

## 6.8. Interacción con la hemina

Para su supervivencia, los protozoarios tripanosomátidos tienen un estricto requerimiento de compuestos que contengan hemo, tales como hemoglobina, hematina o hemina durante su desarrollo.<sup>35</sup> Esta característica se debe a la incapacidad de estos parásitos de sintetizar hemo. Ya que altos niveles de hemina y compuestos similares tienen un gran efecto citotóxico debido a la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), los tripanosomátidos tienen distintas maneras de contrarrestar el stress oxidativo que generaría un exceso de hemo. Por ejemplo, en las especies del género *Plasmodium*, esta detoxificación se lleva a cabo mediante la conversión del hemo a hemozoína, una forma polimérica y no tóxica del hemo. En contraste, en aquellos parásitos del género *Leishmania* y en *Trypanosoma cruzi*, el efecto citotóxico del hemo se evita mediante su conversión a biliverdina, proceso en el cual estaría involucrada la enzima hemo oxigenasa.<sup>36</sup>



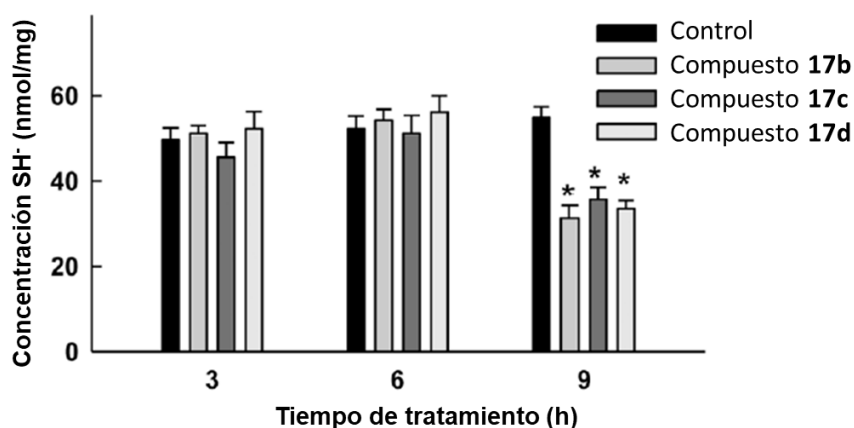
**Figura 6.11.** Interacción de los derivados de quinolina **17b-d** con la hemina. Se utilizó una concentración de hemina de  $7,5 \mu\text{M}$  y diferentes concentraciones de **17b-d** o cloroquina ( $22,5-90 \mu\text{M}$ ) y se midió el espectro de absorción de la hemina. El cociente de absorbancia a  $430 \text{ nm}$  y  $400 \text{ nm}$  ( $A_{430}/A_{400}$ ) fue usado para cuantificar modificaciones en la banda de Soret. Los  $p$ -valores  $< 0,05$  (\*) fueron considerados significativos.

Es un hecho conocido que la actividad antimalárica de las drogas derivadas de quinolina depende de la formación de complejos quinolina-hemo, que inhiben la polimerización del hemo a hemozoína, lo que lleva a la muerte del parásito debido al stress oxidativo provocado por la acumulación de ROS. Considerando la estructura de los compuestos obtenidos y evaluados en el trabajo expuesto en este

capítulo, nuestros derivados de quinolina podrían ejercer su acción antiparasitaria del mismo modo. Para probar esta hipótesis, evaluamos la unión de las quinolinas **17b-d** al grupo hemo (figura 6.11). Como puede observarse, los compuestos mencionados tienen una interacción con la hemina similar a la mostrada por la cloroquina.

### 6.9. Estado redox intracelular

Asumiendo que los derivados de quinolina inhiben la degradación del hemo, se puede concluir que la presencia de éstos en el parásito produciría stress oxidativo. Dado que la cantidad de tioles de bajo peso molecular es un parámetro del estado redox de la célula, esperamos que tras el tratamiento con **17b-d** los niveles de dichos compuestos se vean afectados debido a la formación de especies oxidantes. Para la evaluación del stress oxidativo inducido por estas quinolinas, se cultivaron epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de **17b-d** (35  $\mu$ M) durante 3, 6 y 9 hs. Los resultados, tal como puede observarse en la figura 6.12, muestran que la concentración de tioles se mantiene constante e igual a los parásitos sin tratamiento, en un valor de aproximadamente 52 nmol/mg de proteína, para las tres quinolinas evaluadas tras 3 h y 6 h. Sin embargo, luego de 9 h de tratamiento se observan disminuciones en la concentración de tioles del 43 %, 35 % y 39 % para **17b**, **17c** y **17d** respectivamente. El nivel de grupos -SH disminuye para contrarrestar el stress oxidativo inducido por el tratamiento con quinolinas, lo cual podría confirmar el mecanismo de acción propuesto.



**Figura 6.12.** Concentración de grupos SH, indicadores de stress oxidativo durante el tratamiento con los derivados **17b-d**. Los epimastigotes de *T. cruzi*, que fueron cultivados por 4 días, se incubaron con 35  $\mu$ M de los compuestos **17 b-d** durante 3, 6 o 9 h. La concentración de tioles fue medida espectrofotométricamente mediante reacción con DTNB.

Junto con estas determinaciones se evaluó el estado redox intracelular mediante citometría de flujo. Como se puede ver en la tabla 6.3, el comportamiento de las tres quinolinas fue similar, observándose que la intensidad de la fluorescencia de los epimastigotes con diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) se cuadruplicó luego de 9 h de tratamiento. Este resultado deja en evidencia que el stress oxidativo persiste a pesar de la disminución en el nivel de tioles, lo que provocaría la muerte de los parásitos tratados con estas quinolinas

**Tabla 6.3.** Resultados de la medición de fluorescencia por citometría de flujo utilizando H<sub>2</sub>DCFDA como sonda.

Tiempo de tratamiento (h)	Relación (Gm/Gm <sub>c</sub> )*		
	17b	17c	17d
3	1,10 ± 0,22	1,20 ± 0,35	0,97 ± 0,16
6	0,95 ± 0,25	1,02 ± 0,12	1,08 ± 0,35
9	4,20 ± 0,48**	3,87 ± 0,18**	4,08 ± 0,59**

\*El cálculo de las relaciones Gm/Gm<sub>c</sub> se detalla en el capítulo 7.

## 6.10. Conclusiones

En este capítulo se describe la síntesis y la evaluación biológica de varios derivados de arilaminoquinolina, muchos de ellos nuevos, siendo todos ellos caracterizados mediante métodos espectroscópicos. Dichos productos se obtuvieron con buenos rendimientos llevando a cabo una reacción sencilla y con reactivos relativamente económicos.

La mayoría de los derivados de 2- y 3-aminoquinolina se evaluaron contra la forma promastigote de *Leishmania mexicana* y contra las formas epimastigote, tripomastigote y amastigote de *Trypanosoma cruzi*. Los derivados clorados y fluorados de 3-aminoquinolina (**17b-d**) fueron muy efectivos como agentes antiparasitarios contra *L. mexicana* y *T. cruzi*, mostrando una eficacia comparable al fármaco utilizado como control positivo. Dichos compuestos fueron capaces de inhibir la degradación del hemo, induciendo un daño oxidativo intracelular que no puede ser contrarrestado por los mecanismos de defensa del parásito. Adicionalmente, no mostraron citotoxicidad, por lo que estos productos tienen un gran potencial para ser aplicados en el tratamiento de enfermedades desatendidas como la tripanosomiasis y la leishmaniasis. Como desafíos hacia el futuro sería de

gran interés completar la serie de derivados propuesta, así como evaluar la actividad antiparasitaria de un mayor número de éstos.

## **Bibliografía**

1. Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S. E.; Sachs, J. D.; Savioli, L., Control of neglected tropical diseases. *New England journal of medicine* **2007**, *357* (10), 1018-1027.
2. Aufderheide, A. C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F.; Arriaza, B.; Renier, C.; Wittmers, L. E.; Fornaciari, G., A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (7), 2034-2039.
3. Chagas, C., Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiolojicos e clinicos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1911**, *3* (2), 219-275.
4. Mazza, S.; Montana, A.; Benitez, C.; Janzi, E., Transmisión de "Schizotrypanum cruzi" al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Mepra* **1936**, *28*, 41-46.
5. Bernstein, R. E., Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *Journal of the Royal Society of Medicine* **1984**, *77* (7), 608-609.
6. Darwin, C., *Charles Darwin's Beagle Diary*. Cambridge University Press: 2001.
7. Lent, H.; Wygodzinsky, P., Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History* **1979**, *163* (3), 123-520.
8. Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D. d. S.; Jurberg, J., A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* **2003**, *202* (1), 1-36.
9. Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A., Chagas disease. *The Lancet* **2010**, *375* (9723), 1388-1402.
10. Develoux, M.; Lescure, F.; Le Loup, G.; Pialoux, G., Chagas disease. *La Revue de Médecine Interne* **2009**, *30* (8), 686-695.
11. Urbina, J. A., Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta tropica* **2010**, *115* (1-2), 55-68.
12. Brener, Z.; Gazzinelli, R. T., Immunological Control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. *International archives of allergy and immunology* **1997**, *114* (2), 103-110.
13. Jr, A. R.; Rassi, A.; Little, W. C., Chagas' heart disease. *Clinical cardiology* **2000**, *23* (12), 883-889.
14. Marin-Neto, J. A.; Cunha-Neto, E.; Maciel, B. C.; Simões, M. V., Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* **2007**, *115* (9), 1109-1123.
15. Rassi, A.; Dias, J. C. P.; Marin-Neto, J. A., Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart* **2009**, *95* (7), 524-534.
16. Reithinger, R.; Dujardin, J.-C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S., Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases* **2007**, *7* (9), 581-596.

17. Cox, F. E., History of human parasitology. *Clinical microbiology reviews* **2002**, *15* (4), 595-612.
18. Cox, F. E., *The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases*. The Wellcome Trust: 1996.
19. Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R., Leishmaniasis: a review. *F1000Research* **2017**, *6*.
20. Miranda, O.; González, I., Leishmaniasis cutánea. Presentación de casos. *Rev Cub Med Mil* **2007**, *36* (4), 51-54.
21. Basu, M. K.; Ray, M., Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Critical reviews in microbiology* **2005**, *31* (3), 145-154.
22. Docampo, R.; Moreno, S. N.; Stoppani, A. O.; Leon, W.; Cruz, F. S.; Villalta, F.; Muniz, R. F., Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical pharmacology* **1981**, *30* (14), 1947-1951.
23. Castro, J. A.; deMecca, M. M.; Bartel, L. C., Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology* **2006**, *25* (8), 471-479.
24. Zauli-Nascimento, R. C.; Miguel, D. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K.; Pereira, L. I.; Pelli de Oliveira, M. A.; Ribeiro-Dias, F.; Dorta, M. L.; Uliana, S. R., In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medicine & International Health* **2010**, *15* (1), 68-76.
25. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H., Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical microbiology reviews* **2006**, *19* (1), 111-126.
26. Chakravarty, J.; Sundar, S., Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases* **2010**, *2* (2), 167.
27. Urbina, J. A.; Docampo, R., Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology* **2003**, *19* (11), 495-501.
28. Dorlo, T. P.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de Vries, P. J., Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2012**, *67* (11), 2576-2597.
29. Sindermann, H.; Engel, J., Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **2006**, *100* (Supplement\_1), S17-S20.
30. Ganguly, N., Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. *TDR news* **2002**, *68* (2).
31. Pérez-Victoria, F. J.; Castanys, S.; Gamarro, F., *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2003**, *47* (8), 2397-2403.

32. Carvalho, L.; Luque-Ortega, J. R.; López-Martín, C.; Castanys, S.; Rivas, L.; Gamarro, F., The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55* (9), 4204-4210.
33. Loiseau, P.; Cojean, S.; Schrével, J., Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite: journal de la Société Française de Parasitologie* **2011**, *18* (2), 115.
34. Fernández, M. M.; Malchiodi, E. L.; Algranati, I. D., Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2011**, *55* (1), 86-93.
35. Urbina, J. A., Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2015**, *62* (1), 149-156.
36. Lechuga, G. C.; Borges, J. C.; Calvet, C. M.; de Araújo, H. P.; Zuma, A. A.; do Nascimento, S. B.; Motta, M. C. M.; Bernardino, A. M. R.; de Souza Pereira, M. C.; Bourguignon, S. C., Interactions between 4-aminoquinoline and heme: promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **2016**, *6* (3), 154-164.
37. Krafts, K.; Hempelmann, E.; Skórska-Stania, A., From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology research* **2012**, *111* (1), 1-6.
38. Srivastava, V.; Lee, H., Chloroquine-based hybrid molecules as promising novel chemotherapeutic agents. *European journal of pharmacology* **2015**, *762*, 472-486.
39. Li, Y.; de Kock, C.; Smith, P. J.; Guzgay, H.; Hendricks, D. T.; Naran, K.; Mizrahi, V.; Warner, D. F.; Chibale, K.; Smith, G. S., Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of silicon-containing aminoquinoline organometallic complexes as antiplasmodial, antitumor, and antimycobacterial agents. *Organometallics* **2013**, *32* (1), 141-150.
40. Abouzid, K.; Shouman, S., Design, synthesis and in vitro antitumor activity of 4-aminoquinoline and 4-aminoquinazoline derivatives targeting EGFR tyrosine kinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (16), 7543-7551.
41. Taher, A. T.; Khalil, N. A.; Ahmed, E. M.; Ragab, Y. M., Synthesis of certain 2-substituted-1H-benzimidazole derivatives as antimicrobial and cytotoxic agents. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2012**, *60* (6), 778-784.
42. Fakhfakh, M. A.; Fournet, A.; Prina, E.; Mouscadet, J.-F.; Franck, X.; Hocquemiller, R.; Figadère, B., Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2003**, *11* (23), 5013-5023.
43. Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J., Les chimanines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea Longiflora*. *Journal of natural products* **1993**, *56* (9), 1547-1552.
44. Kraus, J. M.; Tatipaka, H. B.; McGuffin, S. A.; Chennamaneni, N. K.; Karimi, M.; Arif, J.; Verlinde, C. L.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H., Second generation analogues of the cancer drug clinical



candidate tipifarnib for anti-Chagas disease drug discovery. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53* (10), 3887-3898.

45. Kraus, J. M.; Verlinde, C. L.; Karimi, M.; Lepesheva, G. I.; Gelb, M. H.; Buckner, F. S., Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52* (6), 1639-1647.

46. Gopinath, V. S.; Pinjari, J.; Dere, R. T.; Verma, A.; Vishwakarma, P.; Shivahare, R.; Moger, M.; Goud, P. S. K.; Ramanathan, V.; Bose, P., Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry* **2013**, *69*, 527-536.

47. Slater, A. F., Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in Plasmodium falciparum. *Pharmacology & therapeutics* **1993**, *57* (2-3), 203-235.

48. Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K., The structure of malaria pigment  $\beta$ -haematin. *Nature* **2000**, *404* (6775), 307-310.

49. Sullivan, D. J.; Matile, H.; Ridley, R. G.; Goldberg, D. E., A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (47), 31103-31107.

50. Combrinck, J. M.; Mabothe, T. E.; Ncokazi, K. K.; Ambele, M. A.; Taylor, D.; Smith, P. J.; Hoppe, H. C.; Egan, T. J., Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS chemical biology* **2013**, *8* (1), 133-137.

51. Thomé, R.; Lopes, S. C. P.; Costa, F. T. M.; Verinaud, L., Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunology letters* **2013**, *153* (1-2), 50-57.

52. Liñares, G. G.; Parraud, G.; Labriola, C.; Baldessari, A., Chemoenzymatic synthesis and biological evaluation of 2-and 3-hydroxypyridine derivatives against Leishmania mexicana. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (15), 4614-4624.

53. Abdel-Megeed, M. F.; Badr, B. E.; Azaam, M. M.; El-Hiti, G. A., Synthesis, antimicrobial and anticancer activities of a novel series of diphenyl 1-(pyridin-3-yl) ethylphosphonates. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, *20* (7), 2252-2258.

54. Kassis, P.; Brzeszcz, J.; Bénétiau, V.; Lozach, O.; Meijer, L.; Le Guével, R.; Guillouzo, C.; Lewiński, K.; Bourg, S.; Colliandre, L., Synthesis and biological evaluation of new 3-(6-hydroxyindol-2-yl)-5-(Phenyl) pyridine or pyrazine V-Shaped molecules as kinase inhibitors and cytotoxic agents. *European journal of medicinal chemistry* **2011**, *46* (11), 5416-5434.

55. Pez, D.; Leal, I.; Zuccotto, F.; Boussard, C.; Brun, R.; Croft, S. L.; Yardley, V.; Perez, L. M. R.; Pacanowska, D. G.; Gilbert, I. H., 2, 4-Diaminopyrimidines as inhibitors of leishmanial and trypanosomal dihydrofolate reductase. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2003**, *11* (22), 4693-4711.

56. Iwaniuk, D. P.; Whetmore, E. D.; Rosa, N.; Ekoue-Kovi, K.; Alumasa, J.; de Dios, A. C.; Roepe, P. D.; Wolf, C., Synthesis and antimalarial activity of new chloroquine analogues carrying a multifunctional linear side chain. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**, *17* (18), 6560-6566.

57. Stocks, P. A.; Raynes, K. J.; Bray, P. G.; Park, B. K.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A., Novel Short Chain Chloroquine Analogues Retain Activity Against Chloroquine Resistant K1 Plasmodium falciparum. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (23), 4975-4983.
58. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T., Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (24), 10257-10274.
59. Bompard, D.; Núñez-Durán, J.; Rodríguez, D.; Kouznetsov, V. V.; Meléndez Gómez, C. M.; Sojo, F.; Arvelo, F.; Visbal, G.; Alvarez, A.; Serrano-Martín, X.; García-Marchán, Y., Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of Leishmania braziliensis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (14), 4426-4431.
60. Shah, N. M.; Patel, M. P.; Patel, R. G., New N-arylamino biquinoline derivatives: Synthesis, antimicrobial, antituberculosis, and antimalarial evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *54*, 239-247.
61. de Meneses Santos, R.; Barros, P. R.; Bortoluzzi, J. H.; Meneghetti, M. R.; da Silva, Y. K. C.; da Silva, A. E.; da Silva Santos, M.; Alexandre-Moreira, M. S., Synthesis and evaluation of the anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of 4-aminoquinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (15), 4390-4396.
62. Liao, W.; Hu, G.; Guo, Z.; Sun, D.; Zhang, L.; Bu, Y.; Li, Y.; Liu, Y.; Gong, P., Design and biological evaluation of novel 4-(2-fluorophenoxy)quinoline derivatives bearing an imidazolone moiety as c-Met kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (15), 4410-4422.
63. Upadhayaya, R. S.; Dixit, S. S.; Földesi, A.; Chattopadhyaya, J., New antiprotozoal agents: Their synthesis and biological evaluations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (9), 2750-2758.
64. Quintana, P. G.; Garcia Linares, G.; Chanquia, S. N.; Gorjod, R. M.; Kotler, M. L.; Baldessari, A., Improved Enzymatic Procedure for the Synthesis of Anandamide and N-Fatty Acylalkanolamine Analogues: A Combination Strategy to Antitumor Activity. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016* (3), 518-528.
65. Chanquia, S. N.; Boscaro, N.; Alche, L.; Baldessari, A.; Liñares, G. G., An Efficient Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Derivatives of Vanillylamine with Antiherpetic Activity in Acyclovir-Resistant Strains. *ChemistrySelect* **2017**, *2* (4), 1537-1543.
66. Chan, D. M.; Monaco, K. L.; Wang, R.-P.; Winters, M. P., New N-and O-arylations with phenylboronic acids and cupric acetate. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (19), 2933-2936.
67. Evans, D. A.; Katz, J. L.; West, T. R., Synthesis of diaryl ethers through the copper-promoted arylation of phenols with arylboronic acids. An expedient synthesis of thyroxine. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (19), 2937-2940.

68. Lam, P. Y.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M.; Combs, A., New aryl/heteroaryl C–N bond cross-coupling reactions via arylboronic acid/cupric acetate arylation. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39* (19), 2941-2944.
69. Liñares, G. G.; Gismondi, S.; Codesido, N. O.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Rodriguez, J. B., Fluorine-containing aryloxyethyl thiocyanate derivatives are potent inhibitors of Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (18), 5068-5071.

# CAPÍTULO 7

## *Parte experimental*

*...no es el libro que ahora usted tiene en sus manos...*

## 7. Parte experimental

### 7.1. Generalidades

#### 7.1.1. Reactivos y solventes

Los solventes, reactivos y medios de cultivo utilizados en este trabajo de tesis se obtuvieron de Merck (Argentina), Carl Roth (Alemania), VWR (Estados Unidos), Roche (Argentina) y Sigma-Aldrich (Argentina y Estados Unidos). La resina de afinidad Ni-NTA y el kit de cuantificación de proteínas Pierce™ utilizados para el trabajo detallado en el capítulo 5 se obtuvieron de Expedeon (Reino Unido) y Thermo Scientific (Estados Unidos) respectivamente. Los plásmidos recombinantes pET-28b con el gen HLADH fueron gentilmente donados por el Profesor Dr. Diederik Johannes Opperman (University of Free State, Sudáfrica). Los solventes utilizados en procesos de purificación y/o cromatografía se purificaron por destilación fraccionada, mientras que los empleados en las reacciones son de grado analítico y se utilizaron sin ningún tratamiento adicional a menos que se indique lo contrario. Todos los reactivos se utilizaron sin tratamiento previo, salvo que se indique lo contrario.

#### 7.1.2. Biocatalizadores

En el presente trabajo de tesis se utilizaron lipasas de distintos orígenes, tanto comerciales como provenientes de agro-residuos, así como también se utilizó una oxidorreductasa heteróloga (HLADH) obtenida y purificada por mí a partir del plásmido. Los detalles técnicos de dichos biocatalizadores se detallan a continuación.

##### 7.1.2.1. Lipasas comerciales

Lipasa de *Candida antarctica* B (CAL B) (Novozym® 435, Novozymes)

Lipasa de *Candida antarctica*, fracción B, inmovilizada sobre una resina acrílica macroporosa. Es producida por el organismo huésped *Aspergillus oryzae*, luego de haberle transferido el plásmido conteniendo el gen que codifica para la lipasa correspondiente.

Actividad expresada como unidades de laurato de propilo (PLU por sus siglas en inglés): cantidad de enzima que genera 1  $\mu\text{mol}$  de laureato de propilo por minuto en condiciones standard.

Actividad: 7400 PLU/g

Lipasa de *Candida rugosa* (CRL) (tipo VII, Sigma) contiene lactosa

Lipasa de *Candida rugosa* liofilizada sin soporte.

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de aceite de oliva pH 7,7.

Actividad: 905 U/mg

Lipasa de *Rhizomucor miehei* (RMIM) (Lipozyme® RMIM, Novozymes)

Lipasa de cepa seleccionada de *Rhizomucor miehei*, inmovilizada sobre resina de intercambio aniónico.

Actividad determinada por la velocidad de incorporación de ácido palmítico en trioleína a 40°C.

Actividad: 7800 U/g

Lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (TLIM) (Sigma Aldrich)

Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, liofilizada e inmovilizada en Immobead 150.

Actividad:  $\geq 3000$  U/g

1 U corresponde a la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido butírico por minuto a pH 7.5 y 40 °C (tributirina, Cat. No. 91010, como sustrato)

Lipasa pancreática porcina (PPL) (tipo II, Sigma Chemical Co) contiene amilasa y proteasa.

Lipasa de páncreas porcino liofilizada sin soporte (sólido conteniendo aproximadamente 25% en peso de proteína).

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de aceite de oliva a pH 7,7.

Actividad: 190 U/mg (masa de proteína), 44 U/mg (masa de sólido)

Contenido proteico del sólido (p/p): 32,6%

#### **7.1.2.2. Lipasas provenientes de agro-residuos**

Lipasa de *Carica papaya* (CPL)

El látex de *Carica papaya* se extrajo con agua destilada para eliminar el 99% de las proteasas, quedando así autoinmovilizadas las lipasas presentes en el látex. Esta enzima es una donación de la Dra. Georgina Sandoval (CIATEJ, México).

Actividad determinada por la velocidad con la que cataliza la liberación de ácido graso a partir de tributirina.

Actividad: 1500 U/g (masa total de sólido).

### 7.1.2.3. Oxidorreductasas

#### Alcoholdehidrogenasa de hígado de caballo (HLADH)

Alcoholdehidrogenasa de hígado de caballo (HLADH) expresada en *E. coli* (Agilent BL21-Gold (DE3)) a partir de plásmidos Novagen pET-28b conteniendo el gen correspondiente. Dicho plásmido fue obtenido por el Dr. Diederik Johannes Opperman (University of Free State, Sudáfrica).

Actividad determinada espectrofotométricamente para la conversión de CHO en CHL.

Actividad:  $19,97 \pm 1,33$  U/mg

### 7.1.3. Separaciones

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga Sorvall LYNX 4000 Superspeed (Thermo Fischer Scientific) o en una centrífuga SL 16R (Thermo Fischer Scientific), según corresponda.

El lisado de bacterias por ultrasonido se realizó en un equipo Labsonic M con una sonda MS 73 (60 % de amplitud: 4 x 4 min, 0.4 ciclos en hielo, con pausas de 4 min en el medio)

Las cromatografías en columna se realizaron empleando adsorbente Silicagel 60, malla 230-400, (Merck) como adsorbente. Las cromatografías en capa preparativa se realizaron en placas de sílica gel de 20 x 20 cm (0,2 mm de espesor, Silicagel 60F254, Merck) con soporte de aluminio. Las cromatografías en capa delgada se hicieron sobre placas comerciales de 0,2 mm de espesor con soporte de aluminio (F254) usando como reveladores luz ultravioleta a 254 nm, o inmersión en una solución acuosa de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.04 M),  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (0.003 M) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10%). En este último caso se empleó una pistola de aire caliente para lograr un revelado adecuado.

Las cromatografías de afinidad para la purificación de proteínas se realizaron en una columna cargada con níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA).

En el caso de las separaciones, para las reacciones químicas los productos finales se separaron mediante extracción con solvente. En el caso de las reacciones enzimáticas, las separaciones se realizaron mediante filtraciones al vacío.

#### **7.1.4. Cálculos computacionales**

Todos los sustratos se minimizaron en el programa Hyperchem, utilizando el método semiempírico AM1 con el algoritmo de Polak-Ribiere. Los cálculos de docking se realizaron con el programa Autodock 4.2.<sup>1</sup> Las estructuras cristalográficas de partida de TLIM y de CAL B se obtuvieron de la base de datos RCSB, Protein Data Bank (PDB), de la cadena A de la estructura con código 1TIB, y de la estructura con código 1TCA respectivamente. El método fue aplicado considerando rotables todos los enlaces sigma de los sustratos y la enzima rígida. Se utilizó una grilla de 64x52x50 puntos con un espaciado de 0.447Å centrada en el sitio activo de TLIM y se realizaron 200 simulaciones del algoritmo genético. Finalmente, se seleccionaron las mejores soluciones del cluster más probable considerando energía de unión, población de los clusters e interacciones de puente de hidrógeno con la tríada catalítica de la enzima.

#### **7.1.5. Reactores**

Las reacciones se llevaron adelante en erlenmeyers, balones o viales con tapa, utilizando una plancha calefactora con un baño de agua, aceite o arena, un agitador orbital digital Innova 4000 de New Brunswick Scientific Co., un agitador orbital digital MaxQ. Thermo Scientific Co., o en un termo-agitador Hettich para viales según corresponda.

La incubación de las bacterias para la producción de HLADH se hizo en agitadores incubadores New Brunswick™ Innova® 44 (Eppendorf, Alemania).

#### **7.1.6. Caracterización estructural**

Los puntos de fusión se determinaron por triplicado, utilizando un equipo Fisher-Johns.

Métodos espectrofotométricos

Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, E.E.U.U.), equipado con un sistema Peltier de agua PCB 1500.

Métodos espectroscópicos

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN <sup>1</sup>H) se realizaron a 200,1 y 500,14 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y Bruker AM-500 respectivamente. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) se realizaron a 50,2 y 125,76 MHz en un espectrómetro Bruker AC-200 y Bruker AM-500 respectivamente. Todas las muestras se analizaron



en tubos de cuarzo de 5 mm de diámetro y los solventes deuterados empleados se indican en cada caso.

Los desplazamientos químicos para RMN  $^1\text{H}$  se expresan en todos los casos como desplazamiento químico ( $\delta$ ) en una escala de partes por millón (ppm) con respecto al tetrametilsilano (TMS), que es el estándar interno y el 0 de la escala. La multiplicidad de las señales de RMN  $^1\text{H}$  se expresa en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doble doblete (dd), doble doble doblete (ddd), doble triplete (dt), triplete (t), triple triplete (tt) cuadruplete (c), quinteto (qn) y multiplete (m).

Los desplazamientos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  se expresan en todos los casos como desplazamiento químico ( $\delta$ ) en una escala de partes por millón (ppm) y se emplea como estándar interno la señal que corresponde al solvente empleado.

Los experimentos de espectrometría de masa de alta resolución se realizaron con un equipo Thermo Scientific EM/DSQ II – DIP, encontrándose los resultados en un rango de  $\pm 0,02\%$  de los valores teóricos.

#### Métodos cromatográficos

Las cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) realizadas en el marco de esta tesis se llevaron adelante en un equipo Waters 1515 equipado con una bomba isocrática e inyector manual.

Para el trabajo descrito en el capítulo 3 se empleó una columna C-18 Waters Symmetry (100 Å, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm x 150 mm) termostaticada a 30 °C, con un flujo constante de metanol puro de 1,00 mL/min y un detector UV Waters 2489 midiendo en una longitud de onda de 254 nm.

En el desarrollo de la labor mostrada en el cuarto capítulo de esta tesis se empleó una columna de fase reversa Phenomenex Phenogel 5  $\mu\text{M}$  10E5A, 300 x 7.8mm, y como solvente de elución una mezcla metanol:agua 80:20 a un flujo de 1,00 mL/min.

Las cromatografías gaseosas realizadas en el trabajo detallado en el capítulo 5 se llevaron a cabo en un equipo Shimadzu GC2030 (Japón), utilizando una columna  $\beta$ -DEX 120 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ), helio como gas portador y benzoato de metilo como estándar interno. Los detalles del método empleado se muestran en la tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Detalle de los métodos de CG utilizados en el trabajo del capítulo 5.

Programa			Columna	Sustrato	t <sub>R</sub> [min]
Incremento [°C/min]	T [°C]	Hold [min]	β-DEX 120 (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	CHO	13.416
-	70	5		CHL	14.389
20	140	7		GBL	15.125
20	160	4		MB	17.512
20	220	0		1,4-BD	17.933
T(Inyector): 250°C; Detector: FID; T(Detector): 250°C; gas portador: He; Presión: 0.366 bar. Flujo de la columna: 0.5 mL/min; flujo total: 11.4 mL/min; Relación de <i>split</i> : 30.					
CHO: ciclohexanona, CHL: ciclohexanol, GBL: γ-butirolactona, MB: benzoato de metilo, 1,4-BD: 1,4-butanodiol.					
Programa			Columna	Sustrato	t <sub>R</sub> [min]
Incremento [°C/min]	T [°C]	Hold [min]	LIPODEX E 50 m x 0.25 mm x 0.25 μm	MB	7.642
-	60	1		1,4-BD	8.228
50	150	2.2		CinH	10.280
50	160	1.5		CinOH	11.234
50	180	2			
50	220	2			
T(Inyector): 250°C; Detector: FID; T(Detector): 250°C; gas portador: He; Presión: 1,273 bar. Flujo de la columna: 1,0 mL/min; flujo total: 24,0 mL/min; Relación de <i>split</i> : 20.					
MB: benzoato de metilo, 1,4-BD: 1,4-butanodiol, CinH Cinamaldehido, CinOH: Alcohol cinámico					

## 7.2. Síntesis catalizada por lipasas de derivados de vainillilamina activos contra cepas de herpes resistentes al Aciclovir

### 7.2.1. Procedimiento general para la síntesis de *N*-acilvainillilaminas

En primer lugar, se obtuvo vainillilamina a partir de su clorhidrato. Con este fin, se disolvieron 250 mg de clorhidrato de vainillilamina en 5 mL de agua, luego, se agregaron 2 mL de amoníaco concentrado y 5 mL de dietiléter. El recipiente se agitó vigorosamente hasta la aparición de un sólido blanco-beige. El sólido se filtró al vacío teniendo especial cuidado de no exponer el precipitado a la luz natural, y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez hecho lo detallado en el párrafo anterior, se disolvió la vainillilamina (1mmol) en DIPE (5 mL) y se agregaron 5 mg de lipasa TLIM y el ácido graso correspondiente (1mmol). La mezcla se mantuvo a 25 °C y constante agitación a 200 rpm durante todo el transcurso de la reacción. Una vez finalizada la reacción la enzima se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel usando como solvente de elución mezclas de hexano:acetato de etilo (9:1-3:2).

Para evaluar la posibilidad de reutilizar la enzima, ésta se filtró y se lavó numerosas veces y se utilizó para la síntesis de **1f** bajo las mismas condiciones ya detalladas, manteniendo un 75 % de la actividad tras cinco ciclos.

#### ***N*-hexanoilvainillilamina (1a)**

Rendimiento 90% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 54-55 °C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-13); 1.25 (m, 6H, H-11, H-12); 1.65 (qn, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-10); 2.20 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-9); 3.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-); 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-7); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.81 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6); 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-3). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 13.9 (C-13), 22.4 (C-12), 25.5 (C-10), 31.5 (C-11), 36.8 (C-9), 43.6 (C-7), 56.0 (CH<sub>3</sub>O-), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 130.4 (C-5), 145.1 (C-2), 146.6 (C-1), 172.9 (C-8); EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>3</sub> 274.1419. Encontrado: C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>3</sub> 274.1423.

#### ***N*-nonanoilvainillilamina (1b)**

Rendimiento 92% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 57-58 °C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-16); 1.27 (m, 16H, H-11 - H-15); 1.65 (qn, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-10); 2.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-9); 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-); 4.36 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, H-7); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.75 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-6); 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-3). <sup>13</sup>C RMN

(CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (C-16), 22.4 (C-15), 25.8 (C-10), 29.1 (C-13), 29.3 (C-12, C-11), 31.8 (C-14), 36.8 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 (CH<sub>3</sub>O-), 110.7 (C-6), 114.4 (C-3), 120.8 (C-4), 130.2 (C-5), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 173.2 (C-8); EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>3</sub> 316.1889. Encontrado: C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NNaO<sub>3</sub> 316.1887.

### **N-lauroilvainillilamina (1c)**

Rendimiento 99% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 63-66°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-19); 1.28 (m, 16H, H-11 - H-18); 1.65 (qn, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-10); 2.19 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-9); 3.89 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-); 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-7); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.81 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-6); 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-3). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (C-19), 22.7 (C-18), 25.8 (C-10), 29.3-29.7 (C-11 - C-16), 31.9 (C-17), 36.9 (C-9), 43.5 (C-7), 55.9 (CH<sub>3</sub>O-), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 130.4 (C-5), 145.1 (C-2), 146.8 (C-1), 173.1 (C-8); EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>3</sub> 358.2358. Encontrado: C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>3</sub> 358.2360.

### **N-miristoilvainillilamina (1d)**

Rendimiento 99% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 76-78°C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-21); 1.27 (m, 20H, H-11 - H-20); 1.64 (qn, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-10); 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-9); 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-); 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-7); 5.62 (s, 2H, NH-, OH-); 6.76 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6); 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-3). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (C-21), 22.7 (C-20), 25.8 (C-10), 29.3-29.7 (C-11 - C-18), 31.9 (C-19), 36.9 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 (CH<sub>3</sub>O-), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 130.3 (C-5), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 173.0 (C-8); EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NNaO<sub>3</sub> 386.2671. Encontrado: C<sub>22</sub>H<sub>37</sub>NNaO<sub>3</sub> 386.2675.

### **N-palmitoilvainillilamina (1e)**

Rendimiento 99% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 83-85 °C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, H-23); 1.27 (m, 24H, H-11 - H-22); 1.65 (qn, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-10); 2.20 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-9); 3.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O-); 4.35 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H-7); 5.62 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-6); 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-3). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (C-23), 22.7 (C-22), 25.8 (C-10), 29.3-29.7 (C-11 - C-20), 31.9 (C-21), 36.9 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 (CH<sub>3</sub>O-), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 130.3 (C-5), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1),

173.0 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{24}H_{41}NNaO_3$  414.2984. Encontrado:  $C_{24}H_{41}NNaO_3$  414.2989.

### **N-estearoilvainillilamina (1f)**

Rendimiento 94% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 90-91°C.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-25); 1.26 (m, 28H, H-11 - H-24); 1.64 (qn,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H-10); 2.19 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H-9); 3.88 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.35 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.1 (C-25), 22.7 (C-24), 25.8 (C-10), 29.3-29.6 (C-11 - C-22), 31.9 (C-23), 36.9 (C-9), 43.5 (C-7), 55.9 ( $CH_3O^-$ ), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 130.4 (C-5), 145.1 (C-2), 146.6 (C-1), 172.9 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{45}NNaO_3$  442.3297. Encontrado:  $C_{26}H_{45}NNaO_3$  442.3291.

### **N-oleoilvainillilamina (1g)**

Rendimiento 95% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 43-44°C.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-25); 1.26 (m, 20H, H-11, H-12, H-13, H-14, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24); 1.64 (qn,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-10); 2.01 (m, 4H, H-15, H-18); 2.20 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-9); 3.87 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.35 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7); 5.33 (m, 2H, H-16, H-17); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.1 (C-25), 22.7 (C-24), 25.8 (C-10), 27.2 (C-15, C-18), 29.3-29.6 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-19, C-20, C-21, C-22), 31.9 (C-23), 36.9 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 ( $CH_3O^-$ ), 110.7 (C-6), 114.3 (C-3), 120.8 (C-4), 129.7, 129.8 (C-16, C-17), 130.3 (C-5), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 173.0 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{43}NNaO_3$  440.3141. Encontrado:  $C_{26}H_{43}NNaO_3$  440.3143.

### **N-elaidioilvainillilamina (1h)**

Rendimiento 95% de compuesto puro. Sólido blanco. Punto de fusión: 87-88°C.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-25); 1.26 (m, 20H, H-11, H-12, H-13, H-14, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24); 1.64 (qn,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-10); 1.95 (m, 4H, H-15, H-18); 2.19 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-9); 3.88 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.35 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7); 5.37 (m, 2H, H-16, H-17); 5.59 (s, 1H, NH-); 6.76 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.81 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.1 (C-25), 22.7 (C-24), 25.8 (C-10), 29.3-29.6 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-19, C-20, C-21, C-22), 31.9 (C-23), 32.6 (C-15, C-18), 36.9 (C-9), 43.5 (C-7), 55.9 ( $CH_3O^-$ ), 110.7 (C-6), 114.3

(C-3), 120.8 (C-4), 125.5 (C-5), 130.2, 130.5 (C-16, C-17), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 172.9 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{43}NNaO_3$  440.3141. Encontrado:  $C_{26}H_{43}NNaO_3$  440.3139.

### ***N*-linoleoilvainillilamina (1i)**

Rendimiento 93% de compuesto puro. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-25); 1.30 (m, 14H, H-11, H-12, H-13, H-14, H-22, H-23, H-24); 1.65 (qn,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-10); 2.03 (m, 4H, H-15, H-21); 2.18 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-9); 2.76 (t,  $J = 5.9$  Hz), 2H, H-18), 3.87 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.35 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7); 5.33 (m, 4H, H-16, H-17, H-19, H-20); 5.59 (s, 1H,  $NH^-$ ); 6.76 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.1 (C-25), 22.7 (C-24), 25.6 (C-18), 25.8 (C-10), 27.2 (C-15, C-21), 29.3-29.6 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-22), 31.9 (C-23), 36.9 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 ( $CH_3O^-$ ), 110.7 (C-6), 114.4 (C-3), 120.8 (C-4), 127.9, 128.0 (C-17, C-19), 130.0, 130.2 (C-16, C-20), 130.4 (C-5), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 172.8 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{41}NNaO_3$  438.2984. Encontrado:  $C_{26}H_{41}NNaO_3$  438.2988.

### ***N*-linolenoilvainillilamina (1j)**

Rendimiento 93% de compuesto puro. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.97 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-25); 1.30 (m, 8H, H-11, H-12, H-13, H-14); 1.64 (qn,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-10); 2.05 (m, 4H, H-15, H-24); 2.19 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-9); 2.80 (m, 4H, H-18, H-21), 3.86 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.35 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H, H-7); 5.36 (m, 6H, H-16, H-17, H-19, H-20, H-22, H-23); 5.59 (s, 1H,  $NH^-$ ); 6.76 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.80 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.86 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.3 (C-25), 25.5-25.6 (C-18, C-21), 25.8 (C-10), 27.2 (C-15, C-24), 29.3-29.6 (C-11, C-12, C-13, C-14), 36.9 (C-9), 43.6 (C-7), 55.9 ( $CH_3O^-$ ), 110.7 (C-6), 114.4 (C-3), 120.8 (C-4), 127.8 (C-19, C-20), 128.2 (C-17), 128.3 (C-22), 130.2 (C-16), 130.3 (C-5), 131.9 (C-23), 145.1 (C-2), 146.7 (C-1), 173.0 (C-8); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{26}H_{39}NNaO_3$  436.2828. Encontrado:  $C_{26}H_{39}NNaO_3$  436.2832.

### ***N*-araquidonoilvainillilamina (1k)**

Rendimiento 92% de compuesto puro. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-27); 1.30 (m, 6H, H-24, H-25, H-26); 1.72 (qn,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-10); 2.05 (c, 2H,  $J = 7.0$  Hz, H-23); 2.10 (q, 2H,  $J = 6.8$  Hz, H-11); 2.20 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, H-9); 2.79 (m, 6H, H-14, H-17, H-20), 3.85 (s, 3H,  $CH_3O^-$ ); 4.34 (d,  $J = 5.5$  Hz, 2H, H-7); 5.34 (m, 8H, H-12, H-13, H-15, H-16, H-18, H-19, H-21, H-22); 5.59 (s, 1H,  $NH^-$ ); 6.74 (dd,  $J = 2.0$  Hz, 8.0 Hz, 1H, H-4); 6.79 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H, H-6); 6.84 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3).  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  14.3 (C-27), 23.1 (C-26), 25.8 (C-14, C-17, C-20),

25.9 (C-10), 27.0 (C-11, C-23), 29.5 (C-24), 31.7 (C-25), 36.3 (C-9), 43.8 (C-7), 56.1 (CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>), 111.0 (C-6), 116.3 (C-3), 121.0 (C-4), 128.0 (C-16, C-18), 128.4 (C-15, C-19), 129.0 (C-13, C-21), 129.3 (C-12), 130.4 (C-5), 130.8 (C-22), 145.4 (C-2), 147.0 (C-1), 172.9 (C-8); EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>NNaO<sub>3</sub> 462.2984. Encontrado: C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>NNaO<sub>3</sub> 462.2987.

## **7.2.2. Ensayos biológicos**

### **7.2.2.1. Células, virus y reactivos**

Las células Vero utilizadas para los ensayos se cultivaron en medio mínimo esencial Eagle (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (FBS) (MEM 10%) y 0,2 % de gentamicina. Se mantuvo una monocapa en MEM (Gibco) suplementada con 1,5 % de FBS inactivado (MEM 1,5 %).

Los virus de herpes simplex tipo 1 (VHS-1) de las cepas KOS (*wild type*), VHS-1 Field y B2006 (TK-) usadas para los experimentos *in vitro* se propagaron a baja multiplicidad de infección (m.o.i.=0,1).

Se preparó una solución madre de los sustratos en DMSO con una concentración 20 mM y luego ésta fue diluida en MEM 1,5 %.

### **7.2.2.2. Ensayos de citotoxicidad**

Para evaluar la viabilidad celular en presencia de los compuestos **1a-k** utilizamos el clivado de la sal MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un producto azul (formazan). Se midió la absorbancia en un lector de microplacas Eurogenetics MPR-A 4i utilizando una longitud de onda de 550 nm y 660 nm como referencia. Los resultados se expresan como porcentaje de absorbancia de las células tratadas con respecto al blanco.

La concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) se define como la concentración que provoca una disminución del 50 % en la absorbancia.

### **7.2.2.3. Actividad antiviral**

Se infectaron células Vero cultivadas en placas de 96-wells con las cepas KOS, Field y B2006 con una m.o.i de 0,1. Luego de 1 h de adsorción, las células infectadas se dividieron en dos grupos, unas

tratadas y otras como control. Aquellas pertenecientes al primer grupo se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos **1a-k**. Luego de una incubación de 24 h a 37 °C se observó el efecto citopático al microscopio. Se colectaron los sobrenadantes y posteriormente se titularon.

Se infectaron células Vero cultivadas en placas de 24-*wells* con diluciones del virus y se incubaron por 1 h a 37 °C. El inóculo residual se reemplazó por una capa conteniendo metilcelulosa y MEM 2x (1:1). Luego de 48 h de incubación a 37 °C se fijaron las células con formaldehído 10 %, se realizó una tinción con cristal violeta y se contaron las unidades formadoras de placas (PFU). La concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) se definió como la concentración de droga que provocó una reducción del 50 % en el conteo de placas con respecto al control infectado no tratado. El índice de selectividad (SI) se definió como la relación CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

### **7.3. Síntesis catalizada por lipasas de nuevos derivados de ácido hiodesoxicólico**

#### **7.3.1. Procedimiento general para la síntesis catalizada por lipasas de ésteres del ácido hiodesoxicólico**

Se añadieron 10 mg de TLIM a una suspensión de ácido hiodesoxicólico (20 mg) y un equivalente del alcohol correspondiente en diisopropil éter (5 mL). Se agitó la misma a 200 rpm y 55 °C y se controló el avance de la reacción mediante cromatografía en capa delgada. Una vez finalizada la reacción, se filtró la enzima y se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo (1:0-1:1). Para realizar los experimentos de reuso de la enzima esta se filtró y se lavó abundantemente con agua y hexano y se usó nuevamente en las mismas condiciones. TLIM mantuvo una actividad del 80 % luego de tres ciclos.

#### **7.3.2. Procedimiento general para la acetilación catalizada por lipasas**

Se añadieron 10 mg de CAL B a una suspensión de ácido hiodesoxicólico (20 mg) en acetato de etilo (5 mL). Se agitó la misma a 200 rpm y 55 °C y se controló el avance de la reacción mediante cromatografía en capa delgada. Una vez que la reacción finalizó, se filtró la enzima y se evaporó el solvente a presión reducida. Dado que la reacción alcanzó una conversión total no se realizó una purificación del sólido obtenido. Para realizar los experimentos de reuso de la enzima esta se filtró y se lavó abundantemente con agua y hexano y se usó nuevamente en las mismas condiciones. CAL-B mantuvo una actividad del 95 % luego de tres ciclos.



### 7.3.3. Alcohólisis catalizada por lipasas

Se agregó 1 mg de CAL B a una suspensión de ácido 3,6-diacetoxihiodesoxicólico (50 mg) en 10 mL de hexano conteniendo también 1,2 equivalentes de etanol. Dicha suspensión se agitó a 200 rpm y 55 °C y se monitoreó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa delgada. Cuando la reacción concluyó, se filtró la enzima y se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido se purificó mediante cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase fija y como fase móvil mezclas de hexano:acetato de etilo (4:1-1:1).

### 7.3.4. Peracetilación química

Se agitó durante 16 h a temperatura ambiente una mezcla de ácido hiodesoxicólico (100 mg), anhídrido acético (2 mL) y piridina (2 mL), y se controló el avance de la reacción mediante cromatografía en capa delgada. Una vez finalizada la reacción, se agregaron 10 mL de una solución saturada de cloruro de amonio y 10 mL de cloruro de metileno. Luego, se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (3 x 10 mL). Finalmente, se lavó la fase orgánica con una solución saturada de cloruro de sodio (5 x 10 mL), se secó utilizando sulfato de magnesio y se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido (120 mg) se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel, empleando como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo (4:1-1:1)

#### Hiodesoxicolato de etilo (10a)

Rendimiento 95%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.07 (2H, c,  $J = 6.8$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.96 (1H, dt,  $J = 12.2, 5.0$  Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 2.27 (1H, m, H-23b), 2.16 (1H, m, H-23a), 1.21 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 0.86 (3H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-21), 0.85 (3H, s, H-19), 0.60 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.6 (C-24), 71.2 (C-6), 67.8 (C-3), 60.2 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 56.0, 55.8, 48.2, 42.7, 39.8, 39.7, 35.8, 35.4, 35.2, 34.7, 31.2, 31.1, 30.9, 29.8, 29.6, 28.0, 24.1 (C-19), 23.4, 20.6, 18.1 (C-21), 14.1 ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 11.9 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NaO}_4$  443.3137. Encontrado:  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NaO}_4$  443.3139.

#### Hiodesoxicolato de *n*-propilo (10b)

Rendimiento 90%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.06 (1H, dt,  $J = 12.1, 5.3$  Hz, H-6), 4.02 (2H, t,  $J = 6.65$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.62 (1H, m, H-3), 2.34 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 1.13 (3H, d,  $J = 6.2$  Hz, H-21), 0.93 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.89 (3H, s, H-19), 0.63 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.5 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 65.9 (-

OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 55.9, 48.3, 42.8, 39.9, 39.8, 35.9, 35.5, 35.3, 35.0, 31.3, 31.0, 30.2, 29.1, 28.1, 24.2 (C-19), 23.5, 22.9, 22.0, 20.7, 18.2 (C-21), 12.0 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 10.4 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>4</sub> 457.3294. Encontrado: C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>4</sub> 457.3287.

#### **Hiodesoxicolato de *n*-butilo (10c)**

Rendimiento 82% luego de dos purificaciones mediante cromatografía en columna. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 4.10 (1H, c, *J* = 6.1 Hz, H-6), 4.04 (2H, t, *J* = 6.7 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.62 (1H, tt, *J* = 11.2 Hz, 6.3 Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 0.93 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-19), 0.63 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 64.1 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 55.9, 48.4, 42.8, 40.0, 39.8, 35.9, 35.5, 35.3, 35.0, 34.8, 31.3, 31.0, 30.7, 30.2, 29.2, 28.1, 24.2 (C-19), 23.5, 20.8, 19.2, 18.2 (C-21), 13.7 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>4</sub> 471.3450. Encontrado: C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>4</sub> 471.3453.

#### **Hiodesoxicolato de *n*-pentilo (10d)**

Rendimiento 80% luego de dos purificaciones mediante cromatografía en columna. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 4.06 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.04 (1H, dt, *J* = 11.7, 6.8 Hz, H-6), 3.62 (1H, tt, *J* = 11.1 Hz, 6.5 Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.22 (1H, m, H-23a), 0.94 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.90 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, H-21), 0.89 (3H, s, H-19), 0.64 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 64.4 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 55.9, 48.4, 42.8, 39.9, 39.8, 35.9, 35.5, 35.3, 35.1, 34.8, 31.3, 31.0, 30.2, 29.2, 29.2, 28.4, 28.1, 24.2 (C-19), 23.5, 22.3, 20.8, 18.2 (C-21), 14.0 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>NaO<sub>4</sub> 485.3607. Encontrado: C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>NaO<sub>4</sub> 485.3612.

#### **Hiodesoxicolato de *n*-octilo (10e)**

Rendimiento 78%. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 4.07 (3H, m, H-6, -OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 3.64 (1H, tt, *J* = 11.1 Hz, 6.5 Hz, H-3), 2.34 (1H, m, H-23b), 2.22 (1H, m, H-23a), 0.92 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, -OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 0.65 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 64.4 (-OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 55.9, 48.4, 42.8, 39.9, 39.8, 35.9, 35.5, 35.3, 35.1, 34.8, 31.8, 31.3, 31.0, 30.2, 29.2 (x3), 28.7, 28.1, 26.0, 24.2 (C-19), 23.5, 22.6, 20.8, 18.2 (C-21), 14.1 (-OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>NaO<sub>4</sub> 527.4076. Encontrado: C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>NaO<sub>4</sub> 527.4072.

### Hiodesoxicolato de *n*-laurilo (10f)

Rendimiento 83%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.05 (3H, m, H-6,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 3.61 (1H, tt,  $J = 11.1, 6.5$  Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.20 (1H, m, H-23a), 0.91 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, t,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 0.63 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.0 (C-3), 64.5 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 56.1, 55.9, 48.4, 42.8, 39.9, 39.8, 35.9, 35.5, 35.3, 35.0, 34.9, 31.9, 31.3, 31.0, 30.2, 29.7 (x2), 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 28.7, 28.1, 25.9, 24.2 (C-19), 23.5, 22.7, 20.8, 18.2 (C-21), 14.1 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{NaO}_4$  583.4702. Encontrado:  $\text{C}_{36}\text{H}_{64}\text{NaO}_4$  583.4698.

### Hiodesoxicolato de *n*-miristilo (10g)

Rendimiento 85%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.07 (3H, m, H-6,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ ), 3.63 (1H, tt,  $J = 11.0$  Hz, 6.2 Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.22 (1H, m, H-23a), 0.91 (3H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-21), 0.90 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, t,  $J = 6.5$  Hz,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ), 0.63 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.6 (C-24), 71.8 (C-6), 68.3 (C-3), 64.6 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ ), 56.3, 56.1, 48.5, 43.0, 40.1, 40.0, 36.1, 35.7, 35.5, 35.2, 35.0, 32.1, 31.5, 31.2, 30.4, 29.9, 29.8 (x2), 29.7 (x2), 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.8, 28.3, 26.1, 24.4 (C-19), 23.6, 22.9, 20.9, 18.4 (C-21), 14.3 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ ), 12.2 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{NaO}_4$  611.5015. Encontrado:  $\text{C}_{38}\text{H}_{68}\text{NaO}_4$  611.5011.

### Hiodesoxicolato de *n*-palmitilo (10h)

Rendimiento 82%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.07 (3H, m, H-6,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ), 3.64 (1H, tt,  $J = 11.1, 6.5$  Hz, H-3), 2.34 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 0.94 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, t,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ), 0.65 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 64.5 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ), 56.1, 55.9, 48.4, 42.8, 39.9, 39.8, 36.0, 35.5, 35.3, 35.1, 34.8, 31.9, 31.3, 31.0, 30.3, 29.7 (x5), 29.6 (x2), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 28.1, 26.0, 24.2 (C-19), 23.5, 22.7, 20.7, 18.2 (C-21), 14.1 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{40}\text{H}_{72}\text{NaO}_4$  639.5328. Encontrado:  $\text{C}_{40}\text{H}_{72}\text{NaO}_4$  639.5331.

### Hiodesoxicolato de *n*-estearilo (10i)

Rendimiento 80%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  4.05 (3H, m, H-6,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ), 3.64 (1H, tt,  $J = 11.1$  Hz, 6.5 Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 0.93 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, t,  $J = 6.7$  Hz,  $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ), 0.65 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.4 (C-24), 71.6 (C-6), 68.1 (C-3), 64.5 ( $-\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ ), 56.2, 56.0, 48.4,

42.9, 40.0, 39.9, 36.0, 35.6, 35.4, 35.1, 34.9, 32.0, 31.4, 31.1, 30.3, 29.8, 29.7 (x4), 29.6 (x4), 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.7, 28.2, 26.0, 24.2 (C-19), 23.5, 22.7, 20.8, 18.2 (C-21), 14.2 (-OCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub>), 12.1 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>42</sub>H<sub>76</sub>NaO<sub>4</sub> 667.5641. Encontrado: C<sub>42</sub>H<sub>76</sub>NaO<sub>4</sub> 667.5637.

### **Hiodesoxicolato de *n*-bencilo (10j)**

Rendimiento 92%. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 7.35 (5H, s, -CH<sub>2</sub>Ph), 5.11 (2H, s, -CH<sub>2</sub>Ph), 4.05 (1H, dt, *J* = 12.0, 4.8 Hz, H-6), 3.62 (1H, tt, *J* = 11.4 Hz, 6.7 Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-23b), 2.27 (1H, m, H-23a), 0.90 (6H, t, *J* = 6.9 Hz, H-19, H-21), 0.61 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 174.2 (C-24), 136.3 (Ph-C1), 128.7 (Ph, C2,C2'), 128.4 (Ph, C3,C3'), 128.3 (Ph, C4), 71.8 (C-6), 68.3 (C-3), 66.3 (-OCH<sub>2</sub>Ph), 56.3, 56.1, 48.6, 43.0, 40.1, 40.0, 36.1, 35.7, 35.5, 35.2, 35.0, 31.4, 31.1, 30.4, 29.4, 28.3, 24.4 (C-19), 23.6, 20.9, 18.4 (C-21), 12.2 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>4</sub> 505.3294. Encontrado: C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>4</sub> 505.3289.

### **Ácido 3α-acetoxi hiodesoxicólico (11)**

Rendimiento 91% luego de dos purificaciones mediante cromatografía en columna. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 4.71 (1H, tt, *J* = 11.2 Hz, 6.6 Hz, H-3), 4.07 (1H, dt, *J* = 11.6, 4.7 Hz, H-6), 2.37 (1H, m, H-23b), 2.25 (1H, m, H-23a), 2.02 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-21), 0.91 (3H, s, H-19), 0.64 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 179.3 (C-24), 170.6 (-COCH<sub>3</sub>), 74.1 (C-6), 67.9 (C-3), 56.1, 55.9, 48.2, 42.8, 39.9, 39.8, 35.9, 35.3, 35.2, 34.7 (x2), 30.9, 30.8, 28.1, 26.5, 25.3, 24.1 (C-19), 23.4, 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 20.8, 18.2 (C-21), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>NaO<sub>4</sub> 457.2930. Encontrado: C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>NaO<sub>4</sub> 457.2925.

### **3α-Acetoxi-hiodesoxicolato de etilo (12)**

Rendimiento 88% luego de dos purificaciones mediante cromatografía en columna. Aceite incoloro. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 4.73 (1H, tt, *J* = 11.2 Hz, 6.5 Hz, H-3), 4.14 (2H, c, *J* = 6.7 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.07 (1H, dt, *J* = 11.3 Hz, 4.7 Hz, H-6), 2.34 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 2.04 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 1.27 (3H, t, *J* = 6.7 Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.93 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, H-21), 0.93 (3H, s, H-19), 0.65 (3H, s, H-18); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ 174.3 (C-24), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 74.1 (C-6), 67.9 (C-3), 60.2 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 56.0, 48.3, 42.8, 39.9, 39.8, 36.0, 35.3, 35.2, 34.8, 34.7, 31.3, 31.0, 28.1, 26.5, 25.3, 24.2 (C-19), 23.4, 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7, 18.3 (C-21), 14.3 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado [M+Na]<sup>+</sup> C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>5</sub> 485.3243. Encontrado: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>5</sub> 485.3238.

### Ácido 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diacetoxi-hiodesoxicólico (13)

Rendimiento 89%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.14 (1H, dt,  $J = 11.6$  Hz, 4.7 Hz, H-6), 4.70 (1H, tt,  $J = 11.3$  Hz, 6.4 Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-23b), 2.25 (1H, m, H-23a), 2.03 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 2.01 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 0.97 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.64 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  179.5 (C-24), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 73.7 (C-6), 71.0 (C-3), 56.1, 55.9, 45.3, 42.9, 39.8 (x2), 36.0, 35.2, 35.0, 34.6, 31.3, 30.9, 30.7, 28.1, 26.4, 26.2, 24.1 (C-19), 23.3, 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7, 18.2 (C-21), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>6</sub> 499.3036. Encontrado: C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>NaO<sub>6</sub> 499.3039.

### 3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Diacetoxi-hiodesoxicolato de etilo (14)

Rendimiento 85%. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.15 (1H, dt,  $J = 12.2$  Hz, 4.8 Hz, H-6), 4.71 (1H, tt,  $J = 11.4$  Hz, 6.6 Hz, H-3), 4.13 (2H, c,  $J = 6.7$  Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.34 (1H, m, H-23b), 2.23 (1H, m, H-23a), 2.05 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 2.03 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 1.27 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.98 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21), 0.65 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.3 (C-24), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 73.7 (C-6), 71.0 (C-3), 60.2 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.2, 56.0, 45.4, 42.9, 39.9, 36.1, 35.3, 35.0, 34.6, 31.3 (x2), 30.9, 29.7, 28.1, 26.4, 26.2, 24.1 (C-19), 23.3, 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7, 18.3 (C-21), 14.3 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>6</sub> 527.3349. Encontrado: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>6</sub> 527.3352.

### 6 $\alpha$ -Acetoxi-hiodesoxicolato de etilo (15)

Rendimiento 83% luego de dos purificaciones mediante cromatografía en columna. Aceite incoloro.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  5.13 (1H, dt,  $J = 11.6$  Hz, 4.8 Hz, H-6), 4.12 (2H, c,  $J = 6.8$  Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.60 (1H, tt,  $J = 11.2$  Hz, 6.5 Hz, H-3), 2.32 (1H, m, H-23b), 2.21 (1H, m, H-23a), 2.02 (3H, s, -COCH<sub>3</sub>), 1.26 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.96 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-21), 0.64 (3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  174.3 (C-24), 170.5 (-COCH<sub>3</sub>), 71.3 (C-3, C-6), 60.2 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 56.1, 55.9, 45.3, 42.9, 39.9 (x2), 36.1, 35.3 (x2), 34.7, 31.3 (x2), 30.9, 30.3, 30.1, 28.1, 24.1 (C-19), 23.3, 21.4 (-COCH<sub>3</sub>), 20.7, 18.3 (C-21), 14.3 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.0 (C-18). EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>5</sub> 485.3243. Encontrado: C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>NaO<sub>5</sub> 485.3246.

## 7.4. Utilización de un solvente eutéctico profundo como “cosustrato inteligente” en procesos catalizados por HLADH

### 7.4.1. Producción de HLADH

Para la transformación se tomó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido Novagen pET-28b conteniendo el gen que expresa HLADH, y se añadió a 50  $\mu\text{L}$  de células competentes Agilent BL21-Gold (DE3) en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por media hora. Luego, se incubó treinta segundos a 42 °C e inmediatamente se colocó en hielo por cinco minutos. Entonces, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de medio líquido caldo de lisogenia (LB) y se dejó incubando 1 h a 37 °C y 180 rpm.

Una vez transcurrida la hora de incubación, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de la preparación a varias placas de Petri con medio sólido LB agar, y se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Se llenaron matraces estériles con hendiduras con 20 mL de medio líquido LB y 20  $\mu\text{L}$  de solución de kanamicina (50 mg/mL), y luego se tomó una colonia de la placa de agar y se transfirió a cada matraz. Dichos matraces se dejaron incubando toda la noche a 150 rpm y 37 °C en un incubador-agitador New Brunswick™ Innova® 44 (Eppendorf, Alemania).

Al otro día, se añadieron 400 mL de caldo terrific (TB), 400  $\mu\text{L}$  de solución de kanamicina (50 mg/mL) y 4 mL del precultivo detallado anteriormente a matraces con hendiduras de 2 L. Estos matraces se incubaron a 37 °C y 150 rpm por 2,5 h. Una vez finalizada esta etapa se indujeron las células con 200  $\mu\text{L}$  de una solución 1 M de isopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron por 24 h a 25 °C y 150 rpm.

Los cultivos se dividieron en botellas plásticas aptas para centrifuga y se centrifugaron a 9000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Luego, los *pellets* celulares se suspendieron en buffer de lisis (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.0) y se sonicaron (60 % amplitud, 4 x 4 min., 0,4 ciclos en hielo con pausas de 4 minutos en el medio). Una vez hecho esto, los restos sólidos celulares se separaron de la fracción soluble mediante centrifugación a 16000 rpm por 45 minutos a 4 °C, obteniendo un extracto libre de células (CFE), que se purificó utilizando una columna de Ni-NTA para así obtener una solución de HLADH pura, que posteriormente fue liofilizada y guardada a -20 °C.

### 7.4.2. Cinética enzimática

Las determinaciones de cinética enzimática se realizaron sobre la HLADH liofilizada mediante espectrofotometría a 340 nm y 25 °C, usando una concentración de NADH de 0,1 mM y concentraciones de CHO de entre 0-500 mM. La concentración de enzima varió entre 0,0005-0,005 mg/mL. El experimento de control negativo se realizó en ausencia de sustrato.

#### **7.4.3. Preparación de solventes eutécticos profundos**

Los DES se prepararon agregando los componentes correspondientes, ChCl y 1,4-BD, a un balón termostatzado con agua a 80 °C. Dicho balón se mantuvo en constante agitación a 400 rpm por 1 h usando un agitador magnético IKA (IKA, Alemania).

#### **7.4.4. Reducción de cetonas**

Para llevar adelante las reacciones de reducción de cetonas se prepararon soluciones madre de NAD<sup>+</sup>/HLADH disolviendo dichos sustratos en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) e incubándolos a 25 °C durante 30 minutos. Luego, en un vial de vidrio se añadieron 800 µL del DES seleccionado, 100 µL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), 10 µL de ciclohexanona (CHO), y 100 µL de solución madre NAD<sup>+</sup>/HLADH. Los viales se incubaron a 25 °C y 1200 rpm en un agitador para viales Hettich (Alemania) termostatzado.

#### **7.4.5. Inmovilización de HLADH**

Para inmovilizar la enzima en el soporte EziG<sup>®</sup> se adaptó el protocolo del manual. Se preparó un CFE usando buffer fosfato 20 mM (500 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5), se dividió en tres alícuotas de 4 mL y se colocó en tres tubos Falcon. Luego, se añadieron 10 mg de cada soporte EziG<sup>®</sup> (Amber, Coral y Opal) y se incubaron los tubos durante 40 minutos en un agitador orbital a temperatura ambiente. Luego, se midió la concentración total de proteína mediante un kit de cuantificación proteica por BCA (Pierce™) y la actividad de los sobrenadantes y el CFE original por espectrofotometría. Los dos soportes que mostraron una unión significativa de las proteínas (Amber y Coral) se filtraron al vacío usando filtros de papel MN615 (Macherey-Nagel, Alemania) y se utilizaron para la reducción de CHO.

#### **7.4.6. Análisis por cromatografía gaseosa**

La conversión de las reacciones se determinó mediante CG (Shimadzu GC2030, Japón). Para ello, se tomaron muestras de 50 µL de los viales de reacción y se añadieron a tubos plásticos de microcentrífuga de 1,5 mL. Seguidamente se añadieron 250 µL de acetato de etilo con 2 mM de benzoato de metilo como estándar interno, se agitó en un agitador vortex y se centrifugó por un minuto a 13000

rpm. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica y se transfirieron a otro tubo de micro-centrífuga. Entonces, se añadió una punta de espátula de  $\text{MgCl}_2$  para secar, se agitaron los tubos manualmente, se centrifugaron por un minuto a 13000 rpm, se tomaron 150  $\mu\text{L}$  y se transfirieron a viales de CG con un vial de micro-inserción para bajo volumen.

## 7.5. Síntesis de derivados de quinolina con actividad antiparasitaria

### 7.5.1. Procedimiento general para la síntesis de derivados de quinolina

En un balón se agregó 1 mmol de la amino o la hidroxiquinolina correspondiente, 1 mmol de acetato cúprico, 2 mmol del ácido arilborónico correspondiente y una punta de espátula de *molecular sieves* (4 Å). Posteriormente se añadieron 5 mL de diclorometano a la mezcla de reacción y 2 mmol de piridina. Esta mezcla se mantuvo a 25 °C bajo atmósfera de nitrógeno por 18 h, luego se filtró y purificó el sólido obtenido mediante cromatografía en columna de sílica gel, utilizando mezclas de hexano:acetato de etilo como fase móvil (7:3-2:3). Para controlar el avance de la reacción se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se analizaron mediante cromatografía de capa delgada, usando placas comerciales de 0,2 mm (F254) y revelando con luz UV o una solución acuosa de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.04 M),  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (0.003 M) en ácido sulfúrico (10%).

#### 2-(2-Flúor-fenilamino) quinolina (16a)

Rendimiento 66%. Aceite amarillo.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.60 (m, 2H, H-14, H-16), 6.97 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H-3), 7.16 (m, 2H, H-13, H-15), 7.33 (dt,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.61 (dt,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-7), 7.67 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-8), 7.83 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.97 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  111.5 (C-3), 115.6 (d,  $J = 23.4$  Hz, C-13), 122.3 (d,  $J = 9.6$  Hz, C-14, C-16), 123.9 (C-8), 124.5 (C-10), 126.8 (C-15), 127.7 (C-5, C-6), 130.4 (C-7), 130.5 (d,  $J = 9.6$  Hz, C-11), 138.5 (C-4), 147.3 (C-9), 153.9 (C-2), 164.7 (d,  $J = 244.3$  Hz, C-12); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{Na}$  261.0804. Encontrado:  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{Na}$  261.0812.

#### 2-(3-Flúor-fenilamino) quinolina (16b)

Rendimiento 70%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.77 (ddd,  $J_1 = 2.3$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-14), 6.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-3), 7.28 (m, 2H, H-15, H-16), 7.35 (dt,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.62 (m, 2H, H-7, H-12), 7.67 (dd,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 7.9$  Hz, 1H, H-8), 7.84 (dd,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  103.2 (d,  $J = 24.4$  Hz, C-12), 109.5 (d,  $J = 22.4$  Hz, C-14), 111.2 (C-3), 111.9 (C-16), 115.4 (d,  $J = 9.5$  Hz, C-15), 123.6 (C-8, C-10),



127.5 (C-5, C-6), 130.1 (C-7), 130.4 (d,  $J = 9.6$  Hz, C-11), 138.2 (C-4), 147.1 (C-9), 153.6 (C-2), 162.4 (d,  $J = 244.3$  Hz, C-13); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0804. Encontrado:  $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0799.

#### **2-(4-Flúor-fenilamino) quinolina (16c)**

Rendimiento 75%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-3), 7.06 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.31 (dt,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz, 1H, H-6), 7.55 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.60 (dt,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 7.5$  Hz, 1H, H-7), 7.64 (dd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 7.8$  Hz, 1H, H-8), 7.77 (dd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz, 1H, H-5), 7.92 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  111.4 (C-3), 115.8 (d,  $J = 22.5$  Hz, C-13, C-15), 122.6 (d,  $J = 7.8$  Hz, C-12, C-16), 122.7 (C-8), 123.2 (C-10), 126.6 (C-6), 127.4 (C-5), 129.9 (C-7), 136.1 (C-11), 137.9 (C-4), 147.5 (C-9), 154.4 (C-2), 160.0 (d,  $J = 242.6$  Hz, C-14); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0804. Encontrado:  $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0810.

#### **2-(4-Cloro-fenilamino) quinolina (16d)**

Rendimiento 72%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-3), 7.32–7.33 (m, 3H, H-6, H-13, H-15), 7.52 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.61 (dt,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 7.1$  Hz, 1H, H-7), 7.66 (dd,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz, 1H, H-8), 7.79 (dd,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-5), 7.95 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  111.6 (C-3), 116.7 (C-12, C-16), 121.8 (C-8), 123.5 (C-6), 124.1 (C-10), 126.4 (C-14), 127.5 (C-5), 129.5 (C-12, C-16), 130.1 (C-7), 136.7 (C-11), 138.2 (C-4), 149.1 (C-9), 154.6 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{15}H_{11}ClN_2Na$  277.0508. Encontrado:  $C_{15}H_{11}ClN_2Na$  277.0512.

#### **2-(4-Carboxi-fenilamino) quinolina (16e)**

Rendimiento 45%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6.88 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H-3), 7.30 (dt,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz, 1H, H-6), 7.59 (dt,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz, 1H, H-7), 7.64 (dd,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 7.7$  Hz, 1H, H-8), 7.70 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.77 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 7.6$  Hz, 1H, H-5), 7.92 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H-4), 8.00 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-13, H-15);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  112.2 (C-3), 116.7 (C-12, C-16), 123.5 (C-8, C-14), 124.0 (C-10), 127.4 (C-6), 128.2 (C-5), 130.7 (C-7), 132.9 (C-13, C-15), 138.7 (C-4); 141.7 (C-11); 148.3 (C-9); 155.2 (C-2), 165.2 ( $-CO_2H$ ); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{16}H_{12}N_2NaO_2$  287.0796. Encontrado:  $C_{16}H_{12}N_2NaO_2$  287.0790.

### 2-(4-Vinil-fenilamino) quinolina (16f)

Rendimiento 68%. Aceite anaranjado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.16 (dd,  $J_1 = 0.9$  Hz,  $J_2 = 10.9$  Hz, 1H, H-18a), 5.66 (dd,  $J_1 = 0.9$  Hz,  $J_2 = 17.5$  Hz, 1H, H-18b), 6.67 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 17.5$  Hz, 1H, H-17), 6.91 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-3), 7.30 (m, 3H, H-6, H-13, H-15), 7.50 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.58 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 1H, H-7), 7.63 (dd,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-8), 7.77 (dd,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-5), 7.93 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  110.0 (C-3), 112.7 (=CH<sub>2</sub>), 116.7 (C-12, C-16), 120.21 (C-8), 121.9 (C-6), 122.5 (C-10), 124.8 (C-14), 125.9 (C-5), 127.9 (C-13, C-15), 128.5 (C-7), 135.1 (C-11), 136.0 (CH=), 136.6 (C-4), 147.5 (C-9), 153.0 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na 269.1055. Encontrado: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na 269.1053.

### 3-(2-Flúor-fenilamino) quinolina (17a)

Rendimiento 70%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.05 (m, 4H, H-13, H-14, H-15, H-16), 7.39 (dt,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 7.9$  Hz, 1H, H-7), 7.49 (dt,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-6), 7.54 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-4), 7.60 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.98 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-8), 8.64 (s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  114.3 (C-4), 114.9 (d,  $J = 23.4$  Hz, C-13), 122.7 (d,  $J = 8.5$  Hz, C-16), 123.9 (d,  $J = 8.3$  Hz, C-14), 124.9 (C-5), 125.0 (C-6), 125.4 (d,  $J = 2.5$  Hz, C-15), 125.8 (C-7), 127.4 (C-10), 127.6 (C-8), 129.5 (d,  $J = 26$  Hz, C-11), 136.4 (C-9), 142.1 (C-3), 143.0 (C-2), 157.4 (d,  $J = 244.0$  Hz, C-12); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0804. Encontrado: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0809.

### 3-(3-Flúor-fenilamino) quinolina (17b)

Rendimiento 80%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.07 (ddd,  $J_1 = 2.1$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-14), 7.16 (m, 2H, H-15, H-16), 7.37 (dt,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-12), 7.47 (dt,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-7), 7.50 (dt,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz, 1H, H-6), 7.54 (dd,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.1$  Hz, 1H, H-4), 7.61 (dd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.99 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-8), 8.65 (s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  108.5 (d,  $J = 24.2$  Hz, C-12), 111.5 (d,  $J = 22.7$  Hz, C-14), 111.2 (C-3), 113.7 (d,  $J = 2.5$  Hz, C-16), 115.7 (C-4), 117.2 (d,  $J = 8.2$  Hz, C-15), 126.4 (C-5, C-6), 127.2 (C-7), 128.8 (C-10), 129.0 (C-8), 130.8 (d,  $J = 8.0$  Hz, C-11), 137.8 (C-9), 143.4 (C-3), 144.4 (C-2), 158.8 (d,  $J = 242.0$  Hz, C-13); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0804. Encontrado: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0810.

### 3-(4-Flúor-fenilamino) quinolina (17c)

Rendimiento 85%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.89 (sa, 1H, NH), 7.07 (t,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.16 (dd,  $J_1 = 4.7$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.45 (dt,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 7.8$  Hz, 1H, H-7), 7.51 (dt,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 6.7$  Hz, 1H, H-6), 7.57 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-4), 7.61 (dd,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.99 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-8), 8.65 (s, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.7 (C-4), 116.3 (d,  $J = 22.7$  Hz, C-13, C-15), 121.5 (d,  $J = 7.8$  Hz, C-12, C-16), 126.3 (C-5), 126.4 (C-6), 127.2 (C-7), 128.8 (C-10), 129.0 (C-78), 137.5 (d,  $J = 2.6$  Hz, C-11), 137.8 (C-9), 143.5 (C-3), 144.4 (C-2), 158.7 (d,  $J = 242.0$  Hz, C-14); ); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{Na}$  261.0804. Encontrado:  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{FN}_2\text{Na}$  261.0808.

### 3-(4-Cloro-fenilamino) quinolina (17d)

Rendimiento 82%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.02 (sa, 1H, NH), 7.11 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.30 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.49 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 1H, H-7), 7.51 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 1H, H-6), 7.66 (dd,  $J_1 = 1.8$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 7.69 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-4), 8.01 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-8), 8.69 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  117.6 (C-4), 119.7 (C-12, C-16), 126.5 (C-5), 126.9 (C-6), 127.1 (C-14), 127.3 (C-7), 128.7 (C-10), 128.8 (C-8), 129.6 (C-13, C-15), 136.6 (C-11), 140.5 (C-9), 143.6 (C-3), 144.8 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{Na}$  277.0508. Encontrado:  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{Na}$  277.0505.

### 3-(4-Carboxi-fenilamino) quinolina (17e)

Rendimiento 50%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.00 (sa, 1H, NH), 7.47 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 7.0$  Hz, 1H, H-7), 7.49 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 6.9$  Hz, 1H, H-6), 7.63 (dd,  $J_1 = 1.8$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 7.67 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-4), 7.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.91 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-12, H-16), 8.00 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-8), 8.67 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  116.9 (C-12, C-16), 117.8 (C-4), 125.2 (C-14), 126.6 (C-5), 127.0 (C-6), 127.5 (C-7), 128.9 (C-10), 129.0 (C-8), 130.4 (C-13, C-15), 140.4 (C-11), 140.6 (C-9), 143.7 (C-3), 145.0 (C-2), 167.8 ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_2$  287.0796. Encontrado:  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_2$  287.0801.

### 3-(4-Vinil-fenilamino) quinolina (17f)

Rendimiento 75%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.16 (dd,  $J_1 = 0.8$  Hz,  $J_2 = 10.9$  Hz, 1H, H-18a), 5.66 (dd,  $J_1 = 0.8$  Hz,  $J_2 = 17.5$  Hz, 1H, H-18b), 6.04 (sa, 1H, NH), 6.67 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 17.6$  Hz, 1H, H-17), 7.12 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-6, H-12, H-16), 7.38 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.46 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H, H-7), 7.51 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 6.8$  Hz, 1H, H-6), 7.62 (dd,  $J_1 =$

1.6 Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-5), 7.72 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-4), 7.99 (dd,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.6$  Hz, 1H, H-8), 8.68 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  112.1 (=CH<sub>2</sub>), 117.5 (C-4), 118.3 (C-12, C-16), 125.0 (C-14), 126.5 (C-5), 126.7 (C-6), 127.2 (C-7), 127.5 (C-13, C-15), 128.9 (C-8), 131.9 (C-10), 136.1 (CH=), 136.7 (C-11), 141.4 (C-9), 143.5 (C-3), 144.9 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na 269.1055. Encontrado: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na 269.1061.

### 3-(4-Trifluormetil-fenilamino) quinolina (17g)

Rendimiento 64%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.30 (sa, 1H, NH), 7.07 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.16 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.54 (td,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-7), 7.60 (td,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-6), 7.70 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-5), 7.87 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, H-4), 8.07 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-8), 8.77 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  116.2 (C-12, C-16), 120.7 (C-4), 124.3 (q,  $J = 244$  Hz, CF<sub>3</sub>), 126.7 (C-6, C-7), 126.9 (q,  $J = 3.8$  Hz, C-13, C-15), 127.7 (C-5), 128.5 (q,  $J = 28$  Hz, C-14), 128.8 (C-8), 128.9 (C-10), 135.2 (C-3), 144.1 (C-9), 144.2 (C-11), 145.6 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Na 311.0772. Encontrado: C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Na 311.0775.

### 6-(3-Flúor-fenilamino) quinolina (18a)

Rendimiento 72%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.69 (td,  $J_1 = 2.4$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-14), 6.91 (m, 2H, H-15, H-16), 7.26 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-5), 7.34 (dd,  $J_1 = 4.2$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-3), 7.43 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-12), 7.44 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H, H-7), 8.00 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, Hz, 1H, H-4), 8.03 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-8), 8.75 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 4.1$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  104.9 (d,  $J = 24.8$  Hz, C-12), 108.3 (d,  $J = 23.0$  Hz, C-14), 111.1 (C-5), 113.8 (d,  $J = 2.5$  Hz, C-16), 121.6 (C-3), 123.6 (C-7), 129.4 (C-10), 130.6 (C-8), 130.7 (d,  $J = 9.8$  Hz, C-15), 134.7 (C-4), 140.6 (C-9), 144.2 (d,  $J = 10.0$  Hz, C-11), 144.5 (C-6), 147.9 (C-2), 163.7 (d,  $J = 245.0$  Hz, C-13); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0804. Encontrado: C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>2</sub>Na 261.0801.

### 6-(4-Flúor-fenilamino) quinolina (18b)

Rendimiento 75%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.96 (s, 1H, NH), 7.05 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.18 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.18 (dd,  $J_1 = 2.8$  Hz,  $J_2 = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 7.29 (dd,  $J_1 = 4.2$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-3), 7.35 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H-5), 7.91 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-4), 7.98 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-8), 8.70 (dd,  $J_1 = 1.7$  Hz,  $J_2 = 3.9$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  108.2 (C-5), 116.2 (d,  $J = 22.5$  Hz, C-13, C-15), 121.5 (C-7), 122.4 (C-3), 122.1 (d,  $J = 8.0$  Hz, C-12,

C-16), 129.6 (C-10), 130.6 (C-8), 134.3 (C-4), 137.9 (d,  $J = 2.7$  Hz, C-11), 142.5 (C-9), 144.7 (C-6), 147.4 (C-2), 158.7 (d,  $J = 242.0$  Hz, C-14); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0804. Encontrado:  $C_{15}H_{11}FN_2Na$  261.0811.

#### **6-(4-Cloro-fenilamino) quinolina (18c)**

Rendimiento 71%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  5.99 (s, 1H, NH), 7.13 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.29 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.32 (t,  $J_1 = 2.6$  Hz, 1H, H-5), 7.33 (dd,  $J_1 = 4.2$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-3), 7.41 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 7.97 (dd,  $J_1 = 1.9$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-4), 8.03 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-8), 8.73 (d,  $J_1 = 1.7$  Hz,  $J_2 = 4.3$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  109.8 (C-5), 120.3 (C-12, C-16), 121.6 (C-3), 123.2 (C-7), 127.0 (C-14), 129.5 (C-10, C-13, C-15), 130.4 (C-8), 134.7 (C-4), 140.7 (C-11), 141.4 (C-9), 144.0 (C-6), 147.5 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{15}H_{11}ClN_2Na$  277.0508. Encontrado:  $C_{15}H_{11}ClN_2Na$  277.0512.

#### **6-(4-Vinil-fenilamino) quinolina (18d)**

Rendimiento 70%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  5.18 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H, H-18a), 5.67 (d,  $J = 17.6$  Hz, 1H, H-18b), 6.04 (s, 1H, NH), 6.70 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 17.6$  Hz, 1H, H-17), 7.16 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-6, H-12, H-16), 7.33-7.39 (m, 2H, H-3, H-5), 7.40 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.41 (dd,  $J_1 = 2.6$  Hz,  $J_2 = 9.0$  Hz, 1H, H-7), 7.97 (dd,  $J_1 = 1.9$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-4), 8.03 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H-8), 8.73 (s, 1H, H-2);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  109.7 (C-5), 112.0 ( $=CH_2$ ), 118.9 (C-12, C-16), 121.6 (C-3), 123.3 (C-7), 127.4 (C-10, C-13, C-15), 130.4 (C-8), 134.7 (C-4), 136.2 ( $CH=$ ), 136.2 (C-11), 141.5 (C-9), 141.6 (C-6), 147.2 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{17}H_{14}N_2Na$  269.1055. Encontrado:  $C_{17}H_{14}N_2Na$  269.1050.

#### **6-(4-Trifluormetil-fenilamino) quinolina (18e)**

Rendimiento 65%. Aceite amarillento.  $^1H$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  6.26 (s, 1H, NH), 7.20 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.37 (dd,  $J_1 = 4.0$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-3), 7.49 (m, 2H, H-5, H-7), 7.55 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-13, H-15), 8.02 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H-4), 8.06 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-8), 8.79 (dd,  $J_1 = 1.7$  Hz,  $J_2 = 4.2$  Hz, 1H, H-2);  $^{13}C$  RMN ( $CDCl_3$ )  $\delta$  112.7 (C-5), 115.7 (C-14), 116.6 (C-12, C-16), 121.7 (C-3), 123.3 (C-11), 124.0 (C-7), 126.8 (d,  $J = 7.8$  Hz, C-13, C-15), 125.5 ( $CF_3$ ), 129.4 (C-10), 130.8 (C-8), 134.9 (C-4), 145.7 (C-6), 144.8 (C-9), 148.4 (C-2, C-11); EMAR: m/z calculado  $[M+Na]^+$   $C_{16}H_{11}F_3N_2Na$  311.0772. Encontrado:  $C_{16}H_{11}F_3N_2Na$  311.0780.

### 2-(3-Flúor-fenoxi) quinolina (19a)

Rendimiento 66%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.67 (dd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-5), 6.79 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 7.05 (dt,  $J_1 = 2.2$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H, H-16), 7.10 (ddd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 2.1$  Hz,  $J_3 = 8.0$  Hz, 1H, H-15), 7.24 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H-12), 7.24 (td,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-7), 7.37 (td,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-6), 7.58 (dd,  $J_1 = 2.1$  Hz,  $J_2 = 8.2$  Hz, 1H, H-14), 7.61 (dd,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-8), 7.81 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.7 (C-3), 116.2 (d,  $J = 23.0$  Hz, C-14), 116.6 (d,  $J = 29.0$  Hz, C-12), 120.3 (C-10), 122.0 (C-8), 122.6 (C-6), 124.7 (d,  $J = 3.4$  Hz, C-16), 128.4 (C-5), 130.4 (C-7), 131.4 (d,  $J = 9.1$  Hz, C-15), 138.9 (d,  $J = 9.6$  Hz, C-11), 140.2 (C-4), 140.8 (C-9), 162.2 (C-2), 164.5 (d,  $J = 249.0$  Hz, C-13); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FNNaO}$  262.0644. Encontrado:  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FNNaO}$  262.0649.

### 2-(4-Flúor-fenoxi) quinolina (19b)

Rendimiento 69%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.66 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-5), 6.78 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 7.22 (td,  $J_1 = 1.2$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 7.27-7.28 (m, 4H, H-12, H-13, H-15, H-16), 7.36 (dt,  $J_1 = 1.4$  Hz,  $J_2 = 8.9$  Hz, 1H, H-6), 7.60 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 8.8$  Hz, 1H, H-8), 7.80 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.8 (C-3), 117.3 (d,  $J = 23.0$  Hz, C-13, C-15), 120.4 (C-10), 122.1 (C-8), 122.5 (C-6), 128.4 (C-5), 130.3 (C-7), 130.6 (d,  $J = 8.9$  Hz, C-12, C-16), 133.4 (d,  $J = 3.4$  Hz, C-11), 140.0 (C-4), 141.1 (C-9), 162.1 (C-2), 162.3 (d,  $J = 248.0$  Hz, C-14); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FNNaO}$  262.0644. Encontrado:  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{FNNaO}$  262.0640.

### 2-(4-Vinil-fenoxi) quinolina (19c)

Rendimiento 69%. Aceite anaranjado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.28 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H, H-18a), 5.76 (d,  $J = 17.6$  Hz, 1H, H-18b), 6.63 (dd,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-5), 6.72 (dd,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 17.5$  Hz, 1H, H-17), 6.73 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H-3), 7.12 (td,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-7), 7.17 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.26 (dt,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-6), 7.53 (dd,  $J_1 = 1.6$  Hz,  $J_2 = 8.4$  Hz, 1H, H-8), 7.55 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-13, H-15), 7.72 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H, H-4);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.4 (C-3), 115.9 ( $=\text{CH}_2$ ), 120.3 (C-10), 122.1 (C-8), 122.4 (C-6), 127.9 (C-12, C-16), 128.3 (C-5), 128.9 (C-13, C-15), 130.2 (C-7), 135.9 ( $\text{CH}=\text{}$ ), 136.7 (C-14), 138.3 (C-11), 139.9 (C-4), 141.0 (C-9), 162.4 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NNaO}$  270.0895. Encontrado:  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NNaO}$  270.0889.

## 2-(4-Trifluormetil-fenoxi) quinolina (19d)

Rendimiento 71%. Aceite amarillento.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.61 (dd,  $J_1 = 1.1$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-5), 6.79 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 7.24 (td,  $J_1 = 1.0$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H, H-7), 7.36 (dt,  $J_1 = 1.5$  Hz,  $J_2 = 8.5$  Hz, 1H, H-6), 7.62 (dd,  $J_1 = 1.3$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, H-8), 7.45 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-12, H-16), 7.82 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H-4), 7.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-13, H-15);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  115.6 (C-3), 120.4 (C-10), 122.0 (C-8), 122.8 (C-6), 125.7 (q,  $J = 273$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 127.4 (q,  $J = 3.8$  Hz, C-13, C-15), 128.6 (C-5), 129.7 (C-12, C-16), 130.5 (C-7), 131.2 (q,  $J = 32.9$  Hz, C-14), 140.2 (C-4), 140.6 (C-11), 140.9 (C-9), 162.1 (C-2); EMAR: m/z calculado  $[\text{M}+\text{Na}]^+$   $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NNaO}$  312.0612. Encontrado:  $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{F}_3\text{NNaO}$  312.0617.

### 7.5.2. Parásitos

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* se cultivaron en un medio que contenía 3,3 % de infusión cerebro-corazón (Difco), 0,3 % triptosa (Difco), 0,3 % fosfato disódico, 0,04 % cloruro de potasio, 0,03 % de dextrosa y un pH de 7,5, sin necesidad de regulación. Luego de esterilizar el medio se añadieron 100 IU/mL de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hemina y 20 % v/v de suero fetal bovino inactivado por calor. Los cultivos se llevaron adelante a 28 °C en matraces cilíndricos de 15 mL con tapas a rosca, conteniendo 2 mL de medio y se agitaron manualmente dos veces por día. Todos los cultivos se iniciaron con un inóculo tomado del parásito en fase exponencial de crecimiento en el mismo cultivo.

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) se cultivaron en el mismo medio líquido que *Leishmania mexicana*, suplementado con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hemina y siguiendo condiciones publicadas en trabajos anteriores.<sup>2</sup> Cuando se inoculó el parásito se suplementó el medio con 100 IU/mL de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomina y 20 % v/v de suero fetal bovino inactivado por calor. Los cultivos se mantuvieron en la fase exponencial a 28 °C. Los tripomastigotes del flujo sanguíneo se obtuvieron de ratones CF1 infectados realizando punciones cardíacas en el pico de la parasitemia en el día 15 post-infección. Dichos tripomastigotes se mantuvieron infectando ratones CF1 con una edad de 21 días. Los ratones fueron criados en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y tratados según las normas y protocolos establecidos por el Comité de cuidado y uso animal de la Asociación Argentina de Especialistas en Animales de Laboratorio (AADEALC).

### 7.5.3. Ensayos *in vitro* para determinar actividad anti-leishmania

La susceptibilidad de los promastigotes de *Leishmania* a los compuestos evaluados se determinó cultivándolos en un medio libre de células a 28 °C. Los experimentos de crecimiento con promastigotes de *L. mexicana* se iniciaron con  $5 \times 10^6$  parásitos/mL, y los inhibidores se añadieron a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µg/mL a partir de soluciones madre en DMSO.

Como control positivo se usó una solución de 50 µg/mL de geneticina, y se evaluó el crecimiento parasitario cada dos días durante diez días utilizando una cámara Neubauer. La concentración de DMSO en los cultivos (0,1 %) no parece influir el crecimiento parasitario ni la morfología. El IC<sub>50</sub> (50 % de la concentración inhibitoria) se determinó mediante una regresión no-lineal de los datos usando el software Sigma Plot 12.

### 7.5.4. Ensayos *in vitro* para determinar actividad anti-trypanosoma

Para evaluar la inhibición en el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron  $0,75-1,25 \times 10^7$  parásitos/mL en la presencia de concentraciones de 2,5-15 µg/mL de los compuestos sintetizados o benznidazol (usado como control positivo) durante cuatro días. Se evaluó el crecimiento celular contando el número de células por mL de cultivo usando una cámara Neubauer y se expresó como densidad celular (DC). El porcentaje de inhibición (% I) se calculó según la ecuación 7.1.

$$\%I = \left\{ 1 - \left( \frac{DC_{4t} - DC_0}{DC_{4c} - DC_0} \right) \times 100 \right\} \quad (\text{ec. 7.1.})$$

Siendo DC<sub>4t</sub> la densidad celular de los parásitos tratados en el día 4, DC<sub>0</sub> la de los parásitos en el día cero, y DC<sub>4c</sub> la de los parásitos sin tratar (control) al cuarto día.

El efecto tripanocida de las diferentes quinolinas y Bnz se testeó también en tripomastigotes del flujo sanguíneo de acuerdo al protocolo estándar de la OMS, aunque ligeramente modificado.<sup>3</sup> El protocolo consiste en sembrar por duplicado en una placa de 96-*wells* (150 µL/*well*) sangre de ratón conteniendo a los tripomastigotes ( $1,5 \times 10^6$  parásitos/mL), y tratarla con diferentes concentraciones de cada compuesto (0,45-450 µM) o benznidazol (0,38-380 µM). Las placas se incubaron por 24 h, y los parásitos sobrevivientes se contabilizaron utilizando una cámara Neubauer. Los resultados se



expresaron como porcentaje de parásitos lisados (% L) referidos al número de parásitos del control, según la ecuación 7.2.

$$\%L = \left\{ 1 - \left( \frac{DC_t}{DC_c} \right) \times 100 \right\} \quad (\text{ec. 7.2.})$$

Siendo  $DC_t$  y  $DC_c$  la densidad celular de los parásitos tratados y no tratados respectivamente.

Para el análisis de los amastigotes, se infectaron macrófagos de la línea J774 con tripomastigotes transfectados del flujo sanguíneo que expresaban el gen  $\beta$ -galactosidasa, utilizando una relación parásitos:células de 10:1. A las 24 h, los cultivos se lavaron y se agregaron distintas concentraciones de cada compuesto (2-50  $\mu\text{M}$ ) en medio RPMI recién preparado sin rojo de fenol. Transcurridos siete días, se midió la actividad galactosidasausando CPRG como sustrato y midiendo la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (Laboratorios Bio-Rad). En paralelo se efectuaron también controles blancos con células no infectadas. El porcentaje de inhibición se calculó con la ecuación 7.3.

$$\%I = \left\{ 1 - \left( \frac{A_{it} - A_{nit}}{A_{ic} - A_{nic}} \right) \times 100 \right\} \quad (\text{ec. 7.3})$$

Siendo  $A_{it}$  el valor medio de la absorbancia a 570 nm para células tratadas e infectadas,  $A_{nit}$  para células tratadas no infectadas,  $A_{ic}$  para células no tratadas e infectadas y  $A_{nic}$  para células no tratadas ni infectadas. Para calcular el  $IC_{50}$  de cada forma morfológica del parásito, los valores de % I o % L se graficaron versus el logaritmo de la concentración de droga ( $\mu\text{M}$ ) y se realizó una regresión no-lineal (curva sigmoidea) utilizando el *software* Sigma Plot 12.

#### 7.5.5. Ensayos de citotoxicidad

La actividad citotóxica se evaluó *in vitro* utilizando células Vero. Las células se cultivaron en medio RPMI a 37 °C con un 5 % de  $\text{CO}_2$ . Se sembraron  $9 \times 10^5$  células/mL en placas de 24 *wells* y a las 24 h se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos evaluados (5-100  $\mu\text{M}$ ) o benznidazol (5-200  $\mu\text{M}$ ). Pasadas 48 h de incubación las células se lavaron dos veces con PBS y se agregó MTT hasta una concentración final de 0,5 mg/mL. Las placas entonces se incubaron por 1 h a 37 °C. Finalmente, los precipitados azules obtenidos se disolvieron en 0,5 mL de DMSO y se leyeron en un lector de placas (Spectra Count® BS 10001) a 570 nm. Los valores de los *wells* blancos conteniendo sólo medio y los sustratos se restaron de los valores obtenidos para las muestras. Todos los ensayos

realizados con MTT se repitieron dos veces usando tres muestras por experimento. El valor de  $CC_{50}$  se calculó mediante una regresión no lineal (curva sigmoidea) a partir del porcentaje de células viables y del logaritmo decimal de la concentración de droga.

#### **7.5.6. Unión a hemina**

La interacción de las quinolinas con la hemina (que se encuentra en condiciones no polimerizantes) se evaluó espectrofotométricamente monitoreando la banda de Soret. El sistema contenía buffer fosfato de sodio pH 7,4 en una concentración 0,23 M, 1 % SDS, 7,5  $\mu$ M de hemina y diferentes concentraciones de los compuestos evaluados (22,5-90  $\mu$ M). El espectro de absorción de la hemina se midió utilizando un espectrofotómetro Hewlett-Packard 8452 con arreglo de diodos. Se utilizó la relación de absorbancia entre 430 nm y 400 nm ( $A_{430}/A_{400}$ ) para cuantificar modificaciones en la banda de Soret, utilizando cloroquina como control positivo.

#### **7.5.7. Actividad redox sobre tioles**

Se incubaron epimastigotes de *T. cruzi* en la fase logarítmica de crecimiento en presencia de **17 b-d** (35  $\mu$ M) durante 3, 6 o 9 h. Los parásitos tratados se colectaron mediante centrifugación a 12000g durante 10 minutos, se lavaron y se resuspendieron en buffer fosfato pH 7,4, 50 mM. Se sonicaron las células en un equipo Soniprep 150 durante 45 s. El homogenato resultante (H) se utilizó para medir el nivel de grupos -SH y contenido proteico. Para cuantificar tioles el homogenato H se trató con ácido tricloroacético 50 % hasta llegar a una concentración final de 5 %, se descartó la proteína precipitada por centrifugación y se midió la concentración de tioles reducidos en el sobrenadante utilizando el compuesto cromogénico 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (DTNB), siguiendo un protocolo ya descrito.<sup>4</sup> La concentración total de proteínas se determinó de acuerdo al método de Lowry, para así expresar el contenido de grupos -SH por mg de proteína.<sup>5</sup>

### 7.5.8. Actividad oxidativa intracelular

Se midió la inducción de estrés oxidativo intracelular usando la sonda fluorescente sensible a oxidantes H<sub>2</sub>DCFDA. Se incubaron epimastigotes de *T. cruzi* creciendo en fase logarítmica con **17 b-d** (35 μM) durante 3, 6 o 9 h. Los parásitos tratados se tiñeron por 45 minutos en la oscuridad usando H<sub>2</sub>DCFDA en una concentración de 10 μM y a 37 °C. Como control positivo los parásitos se trataron con peróxido de hidrógeno 0,2 mM. Luego, se analizó la intensidad fluorescente de la diclorofluoresceína (DCF) en las células con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur, usando una longitud de onda de excitación de 480 nm y una de emisión de 530 nm. Los resultados se expresaron como la relación  $G_{mt}/G_{mc}$ , donde  $G_{mt}$  y  $G_{mc}$  corresponden a la media geométrica de los histogramas obtenidos para las células tratadas y no tratadas (control) respectivamente. El análisis de los datos de la citometría de flujo se hizo con el *software* WinMDI 2.9.

### 7.5.9. Análisis estadístico

Los resultados presentados son representativos de entre tres a cuatro experimentos independientes, realizados por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como promedios  $\pm$  desviación estándar de la media (SEM). La significancia de las diferencias se evaluó mediante un test *t* de Student o *One-way ANOVA*; los p-valores < 0,05 (\*) y < 0,01 (\*\*) se consideraron significativos.

## **Bibliografía**

1. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30* (16), 2785-2791.
2. Ciccarelli, A.; Araujo, L.; Batlle, A.; Lombardo, E., Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **2007**, *134* (7), 959-965.
3. Ciccarelli, A. B.; Frank, F. M.; Puente, V.; Malchiodi, E. L.; Batlle, A.; Lombardo, M. E., Antiparasitic effect of vitamin B12 on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2012**, *56* (10), 5315-5320.
4. Thomé, R.; Lopes, S. C. P.; Costa, F. T. M.; Verinaud, L., Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunology letters* **2013**, *153* (1-2), 50-57.
5. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **1951**, *193* (1), 265-275.

# CAPÍTULO 8

## *Conclusiones finales*

*...sino justamente todo lo que le pasó.*

## 8. Conclusiones finales

Durante el desarrollo de la presente tesis se aplicaron conocimientos y técnicas relacionadas a la síntesis orgánica, mayoritariamente en el área de la biocatálisis. Siguiendo esta metodología, logramos obtener resultados positivos con sustratos de una gran variabilidad estructural, tal como se desprende de la lectura de este libro. Durante el proceso de realización de este trabajo tuve la fortuna de conocer y trabajar en colaboración con numerosos científicos de varias disciplinas, que en todos los casos no solo demostraron ser excelentes profesionales sino también grandes personas.

En los primeros dos capítulos de esta tesis se presenta una introducción general de los temas a desarrollar luego, así como los objetivos específicos de este trabajo.

En el capítulo 3 se describe la síntesis de once vainillilamidas siguiendo una estrategia biocatalítica, el proceso para arribar a las condiciones óptimas de reacción, así como también se muestra un estudio computacional que arroja información sobre los parámetros de dicho proceso. Por otro lado, también se detalla la evaluación de dichos compuestos como antiherpéticos. Notablemente, dos de los compuestos sintetizados fueron activos frente a cepas resistentes al Aciclovir que, si bien no son las infecciones más comunes, suponen un gran problema en pacientes inmunocomprometidos. Por esta razón los compuestos obtenidos podrían significar un interesante punto de partida para el desarrollo de nuevos antivirales focalizados en este tipo de infecciones.

En el cuarto capítulo de este libro se detalla la síntesis de una serie de derivados de ácido hiodesoxicólico (HDCA), un ácido biliar muy poco estudiado y con aplicaciones potenciales muy interesantes. La mayoría de los productos obtenidos son nuevos. Además, se describe la metodología utilizada para arribar a las mejores condiciones de síntesis, y un estudio computacional para poder entender con mayor profundidad los resultados experimentales obtenidos.

El trabajo mostrado en el capítulo 5 se desarrolló íntegramente en la Universidad de Aarhus, Dinamarca, en una estadía realizada durante el año 2019. En dicho capítulo se muestra por primera vez la aplicación de un solvente eutéctico profundo (DES) como un “sustrato inteligente”, es decir, tanto como co-solvente como para la regeneración del cofactor en un ciclo redox. Se obtuvieron resultados prometedores para la obtención de ciclohexanol a partir de ciclohexanona, así como también para la obtención de alcohol cinámico, un compuesto de gran interés industrial. Aún hay mucho trabajo por hacer sobre estos sistemas, sin embargo, estos avances positivos podrían significar un cambio de paradigma para la creación de procesos químicos mucho más sostenibles y eficientes.

En el capítulo 6 se describe el proceso de síntesis y la evaluación biológica de varios derivados de arilaminoquinolina, varios de ellos compuestos nuevos. Teniendo en cuenta los efectos adversos

graves que presentan las drogas más utilizadas contra la enfermedad de Chagas y las diferentes Leishmaniasis, es interesante notar la potente actividad antiparasitaria y la baja toxicidad de algunos de los compuestos sintetizados, por lo que presentan un buen potencial para ser aplicados en el tratamiento de estas enfermedades.

El capítulo 7 corresponde a la parte experimental, donde se detallan los reactivos usados, las técnicas de síntesis, los equipos y también se describen los espectros que se utilizaron para la identificación de los productos obtenidos.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

“An Efficient Lipase-Catalyzed Synthesis of Fatty Acid Derivatives of Vanillylamine with Antiherpetic Activity in Acyclovir-Resistant Strains”. Santiago N. Chanquia, Nadia Boscaro, Laura Alché, Alicia Baldessari, Guadalupe García Liñares. *Chemistry Select* **2017**, 2, 1537-1543.

“Bile acids: Lipase-catalyzed synthesis of new hyodeoxycholic acid derivatives”. Santiago N. Chanquia, Erika Ripani, Alicia Baldessari, Guadalupe García Liñares. *Steroids* **2018**, 140, 45-51.

“Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents”. Santiago N. Chanquia, Facundo Larregui, Vanesa Puente, Carlos Labriola, Elisa Lombardo, Guadalupe García Liñares. *Bioorganic Chemistry* **2019**, 83, 526-534.

“Deep Eutectic Solvents as Smart Cosubstrate in Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Reductions”. Santiago N. Chanquia, Lei Huang, Guadalupe García Liñares, Pablo Domínguez de María, Selin Kara. *Catalysts* **2020**, 10 (9), 1013.