



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

***“Síntesis y análisis conformacional de
dehidroparadoles como potenciales agentes
antimicobacterianos”***

Michelle Tatiana Custodio Castro

Director: Dr. Pedro A. Colinas

Tutor: Dr. Leonardo E. Riafrecha

2020

Este trabajo final de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular, correspondiente a la asignatura “Laboratorio de Procesos Biotecnológicos” fue realizada en el Centro de Estudio de Compuestos Orgánicos (CEDECOR) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Pedro A. Colinas y la supervisión del Dr. Leonardo E. Riafrecha.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, y a todos los Docentes, quienes desde el curso de ingreso hasta la última materia de la carrera han contribuido tanto en mi formación profesional como personal.

Al CEDECOR por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme su espacio y equipos.

A mi Director Pedro A. Colinas y Tutor Leo Riafrecha, quienes me permitieron ser parte de su grupo de trabajo, con gran vocación docente y paciencia me han enseñado y acompañado durante esta última etapa de la carrera.

Por último, a toda mi Familia, quienes han estado presentes y apoyándome siempre.

Índice de contenidos

1. OBJETIVOS	5
1.1. Objetivo general.....	6
1.2. Objetivos particulares	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1. TUBERCULOSIS - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	8
2.2. ANHIDRASAS CARBONICAS	9
2.3. MECANISMO DE CATÁLISIS EN LAS ANHIDRASAS CARBÓNICAS Y SU INHIBICIÓN	10
2.4. INHIBIDORES DE ACs	11
2.5. ANÁLOGOS DE DEHIDROPARADOLES COMO ANTIMICOBACTERIANOS Y QUIMIOPREVENCIÓN	14
2.6. DISEÑO SINTÉTICO	16
3. EXPERIMENTAL	17
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.2. SÍNTESIS DE DEHIDROPARADOLES	20
3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS DEHIDROPARADOLES FRENTE A LAS DISTINTAS ISOZIMAS DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA	28
3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA	29
4. DISCUSIÓN	30
4.1. SÍNTESIS DE LOS DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE VAINILLINA	31
4.1.1. Condensación aldólica.....	31
4.2. DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE CETONAS ALIFÁTICAS	32
4.2.1. NaOH como catalizador.....	32
4.2.2. Pirrolidina como catalizador	32
4.3. DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE ACETOFENONA	33
4.3.1. NaOH como catalizador.....	33
4.3.2. L-prolina-Et ₃ N como catalizador	34
4.4. ANÁLISIS DE LOS DEHIDROPARADOLES OBTENIDOS EMPLEANDO ¹ H y ¹³ C RMN	35
4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS DEHIDROPARADOLES FRENTE A LA ANHIDRASA CARBÓNICA	38
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA	40
5. CONCLUSIONES	42

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Síntesis y estudio conformacional de dehidroparadoles (enonas) derivadas de la vainillina como potenciales agentes antimicobacterianos.

1.2. Objetivos particulares

- Estudiar las condensaciones aldólicas de la vainillina con diferentes cetonas.
- Evaluar la influencia de las diversas condiciones de reacción (catalizador, temperatura, solvente, etc.) en el rendimiento de la reacción.
- Realizar el estudio conformacional de las enonas obtenidas empleando resonancia magnética nuclear.
- Evaluar la actividad inhibitoria frente a la anhidrasa carbónica I, II, IX, XII y a las isozimas presentes en *M. tuberculosis* (estudio que fue llevado a cabo en el grupo del Prof. Claudiu T. Supuran en la Universidad de Florencia, Italia).
- Evaluar la actividad antimicobacteriana de las enonas, en colaboración con el Dr. Ricardo Morbidoni (Facultad de Ciencias Médicas, UNR).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. TUBERCULOSIS - *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis (TB) es una enfermedad sistémica crónica que afecta principalmente el sistema respiratorio; es causada por la *Mycobacterium tuberculosis*, y se adquiere principalmente por vía aérea. Puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado. Actualmente, se considera un severo problema de salud pública la presencia de cepas farmacorresistentes.

Se estima que gran parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis*. La mayoría de los casos (92%) de enfermedad tuberculosa se han registrado en los países en desarrollo. La tuberculosis continúa siendo un importante problema de salud pública, al igual que la coinfección TB/VIH, a nivel mundial.

Una tercera parte del incremento en los casos de tuberculosis a nivel mundial se atribuye a la propagación del VIH. El impacto de la coinfección VIH y tuberculosis es bidireccional. La tuberculosis, al aumentar la carga viral, acelera la progresión de la infección por VIH a sida, y con ello a la muerte.¹

En nuestro país, la TB continúa siendo un importante problema sanitario que afecta mayoritariamente a población joven y activa en edad productiva. Nuestro patrón epidemiológico preponderante se encuentra inmerso en lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó “Tuberculosis en grandes ciudades”, que se caracteriza por una urbanización acelerada, gran concentración de población pobre, barreras de acceso a los servicios de salud y fragmentación de la atención en los mismos. Durante el año 2017 se registraron 11.659 casos de tuberculosis y 706 fallecimientos, siendo la tercera causa de muerte debido a enfermedades infecciosas.²

En abril del 2018 el primer boletín sobre tuberculosis en la Argentina reveló que en se notificaron 11.560 casos, de los cuales el 50 por ciento se registra en edad reproductiva, de 20 a 44 años.³

¹ Salud, O.P.d.I., *Coinfección TB/VIH: Guía Clínica.*, 2010.

² Bossio, J. C.; Arias, S.; Radosevich, A.; Luque, G.; et al., *BOLETÍN SOBRE TUBERCULOSIS EN LA ARGENTINA*, 2019.

³ Fuente: Ministerio de la Salud de la Nación <http://msal.gov.ar/htm/site>.

En la actualidad la infección de tuberculosis incluye la tuberculosis multirresistente, por lo que se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos que no posean resistencia cruzada con medicamentos antimicobacterianos actuales y con un mínimo de toxicidad para el paciente.

En los últimos años, la investigación sobre *M. tuberculosis* ha avanzado mucho, principalmente, a partir del conocimiento de su genoma⁴ lo cual dio lugar al descubrimiento de posibles nuevos objetivos farmacológicos, que puedan conducir al desarrollo de compuestos con un nuevo mecanismo de acción, ayudando así a resolver el problema de resistencia a los medicamentos.

2.2. ANHIDRASAS CARBONICAS

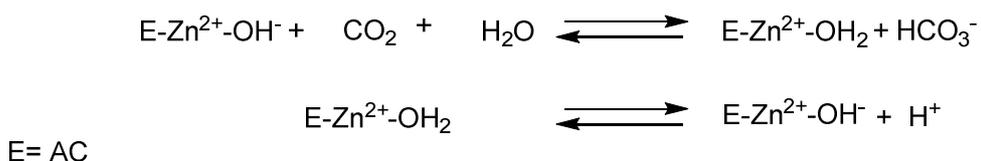
Dentro de estos nuevos objetivos farmacológicos se han identificado tres anhidrasas carbónicas (ACs) que pertenecen a la clase β .⁵ Las ACs constituyen una familia de metaloenzimas de Zn que catalizan una reacción tan simple pero importante, como es la hidratación reversible del dióxido de carbono (Ecuación 1), por lo cual se encuentran involucradas en el mantenimiento y regulación del pH intracelular.⁶ Estas enzimas constituyen un excelente ejemplo de evolución convergente, y además de las α -ACs presentes en los mamíferos hay cuatro familias no relacionadas (β -, γ -, δ - y ϵ -AC).⁷ Las β -ACs fueron caracterizadas en un gran número de patógenos humanos tales como: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc.⁵

⁴ Cole, S.T.B., R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E., III; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G., *Nat. Rev.* **1998**, 393-537.

⁵ Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Maresca, A.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3300.

⁶ Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3467.

⁷ Supuran, C. T. *Nature Rev. Drug Disc.* **2008**, *7*, 168-181.



Ecuación 1. Proceso catalítico para las α -ACs.

La inhibición de las isozimas de la anhidrasa carbónica tienen aplicaciones en el desarrollo de drogas antiglaucoma, anticonvulsivas y antitumorales; se ha descrito su posible aplicación como agentes antifúngicos y antibacteriales mediante un nuevo mecanismo de acción. En este sentido se ha encontrado que de las tres β -anhidrasas carbónicas halladas en la micobacteria (denominadas genéricamente mtACs), al menos una de ellas (mtAC 2 o RV3588c) es esencial para el crecimiento de la bacteria.⁵ Si bien no se puede excluir que las otras dos isozimas cumplan funciones biológicas importantes, esto no ha sido determinado, aunque se han encontrado indicios que la mtAC 3 (Rv3273) podría estar involucrada en el proceso infeccioso. En base a esta información el desarrollo de inhibidores de las anhidrasas carbónicas presentes en la micobacteria podría dar lugar a una nueva terapia contra la tuberculosis.⁸

2.3. MECANISMO DE CATÁLISIS EN LAS ANHIDRASAS CARBÓNICAS Y SU INHIBICIÓN

El ion Zn (II) presente en todas las ACs es esencial para el proceso catalítico y se encuentra ubicado en la zona inferior de una profunda hendidura de 15 Å perteneciente al sitio activo, según ha podido ser determinado mediante cristalografía de Rayos X.⁷ Si bien un análisis detallado de los sitios activos de las tres mtACs excede los objetivos del presente trabajo, se describirá la coordinación del ion zinc en el sitio activo de mtAC 1 (Figura 1). Esta enzima posee un ion metálico coordinado mediante 2 residuos de cisteína (Cys35 y Cys91) y uno de histidina (His88) y una molécula de agua o ion oxhidrilo, el cual es el nucleófilo que atacará al CO₂ y lo transformará en bicarbonato. Pero en el

⁸ Supuran, C. T. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 831-844.

caso de esta enzima, dos aminoácidos (Asp-Arg) presentes en el sitio activo también se encuentran involucrados en el mecanismo de activación de la molécula de agua unida al Zn(II), a través de la formación de puentes de hidrógeno, que pueden favorecer la pérdida del protón y la generación del ion oxhidrilo como cuarto ligando.^{9,10}

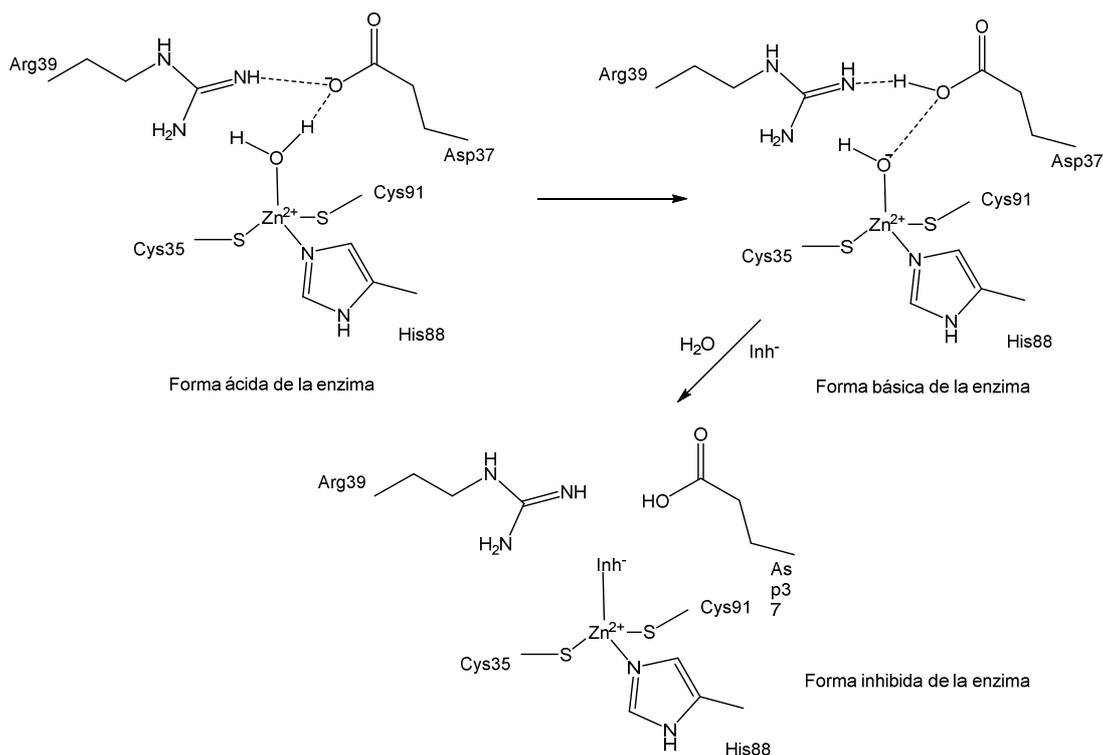


Figura 1. Coordinación del ion zinc en el sitio activo y mecanismo de inhibición de la mtAC 1.

2.4. INHIBIDORES DE ACs

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que se unen a las enzimas y disminuyen su actividad. La inhibición de ACs tiene aplicaciones en el campo farmacológico como agentes antiglaucoma, anticonvulsivos, anticancerígenos y antimicrobianos, entre otros.

⁹ Covarrubias, A. S.; Larsson, A. M.; Högbom, M.; Lindberg, J.; Bergfors, T.; Björkelid, C.; Mowbray, S. L.; Unge, T.; Jones, T. A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18782.

¹⁰ Covarrubias, A. S.; Bergfors, T.; Jones, T. A.; Högbom, M. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4993.

Algunos inhibidores de ACs (IACs) son:

- (i) Sulfonamidas, sulfamatos y sulfamidas: se unen en forma desprotonada, es decir como aniones, al Zn (II) presente en el sitio activo reemplazando al cuarto ligando (molécula de agua o ion oxhidrilo).
- (ii) Cumarinas: exhiben un modo de enlace muy diferente sin interacciones entre la molécula inhibidora y el ion Zn (II) del sitio pero ocluyendo al entrar al mismo.
- (iii) Fenoles: se unen similar a las poliaminas, por interacción con una molécula de agua unida al cinc a través de puentes de hidrogeno y sin interacción directa entre el Zn y el inhibidor.
- (iv) Metoxilos: se unen dentro del sitio activo enzimático sin interacción con el ion cinc y por medio de diferentes interacciones con residuos de aminoácidos y moléculas de agua.

Dentro de estos inhibidores se destacan los fenoles dado que su interacción con la anhidrasa carbónica es completamente diferente a las encontradas con los inhibidores tradicionales, por lo cual se constituyen en moléculas altamente interesantes para el desarrollo de nuevos inhibidores. Además, pese a que la potencial actividad biológica de los fenoles sintéticos y aquellos hallados en la naturaleza es ampliamente conocida (principalmente como antioxidantes), los mismos sólo han sido estudiados como inhibidores de las ACs en los últimos cinco años.¹¹ Recién en el año 1995 el grupo de Christianson reportó la

¹¹ Durdagi, S.; Şentürk, M.; Ekinci, D.; Balaydin, H. T.; Göksu, S.; Küfrevioğlu, Ö. İ.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (4), 1381–1389.

estructura de Rayos X del aducto entre el fenol y la anhidrasa carbónica humana II (Figura 2).¹² El análisis cristalográfico mostró que el inhibidor se unía de una manera única: el grupo OH se encuentra fijado a través de un puente de hidrógeno al cuarto ligando del cinc, el cual es una molécula de agua, o mejor dicho un ion oxhidrilo porque la cristalización del aducto fue llevada a cabo a pH=10. Hay evidencia de un segundo puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del fenol y el NH de la amida del residuo Thr199.

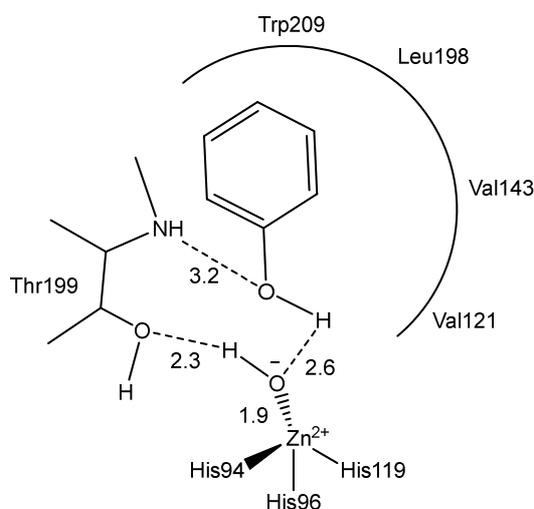


Figura 2. Representación esquemática de las interacciones del fenol con la hAC II (se representan distancias en Amstrong y los puentes de hidrógeno se representan como líneas punteadas).

También se sabe que la metilación es una de las modificaciones químicas más comunes del oxhidrilo en el fenol. Pero sólo recientemente los derivados de metoxifenilo han sido investigados como inhibidores de la anhidrasa carbónica porque se consideraba que no tenían incidencia en la inhibición de AC.¹¹ Inesperadamente se obtuvieron, di y tri-metoxibencenos son IACs bastante similares o mejores que fenol. Así se encontró que la unión de metoxibenceno-sustituido dentro del sitio activo enzimático se realiza sin interacción con el ion

¹² Nair, S. K.; Ludwig, P. A.; Christianson, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3659–3660.

cinc y por medio de diferentes interacciones con residuos de aminoácidos y moléculas de agua.¹¹ Los compuestos se sitúan entre el sitio de unión del fenol y el sitio de unión de la cumarina, llenando el centro de la cavidad enzimática, sin embargo esta hipótesis aún no está confirmada por cristalografía. De este modo surge la posibilidad de diseñar inhibidores de la anhidrasa carbónica. Sin embargo, muy pocos de estos derivados han sido investigados hasta el momento.¹¹

2.5. ANÁLOGOS DE DEHIDROPARADOLES COMO ANTIMICOBACTERIANOS Y QUIMIOPREVENCIÓN

Muchos productos naturales son fuente de nuevos agentes quimiopreventivos, recientemente la investigación ha centrado el foco en fitoquímicos anticarcinogénicos derivados de plantas medicinales o comestibles. Este nuevo enfoque denominado quimio-prevención se refiere a la reducción del riesgo de cáncer favoreciendo la ingesta de factores protectores y/o fortificar la capacidad de defensa fisiológica del organismo. Han sido reportados principalmente compuestos naturales fenólicos, que poseen actividades antioxidantes y propiedades anti-inflamatorias.

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una especie ampliamente consumida en el mundo. Es usado en la medicina tradicional oriental¹³, administrada para síntomas tales como el resfriado común, desordenes digestivos, reumatismo, neuralgia, mareos. Como principio activo farmacológico contiene el 6-gingerol y en menor proporción 6-paradol, compuesto fenólico picante presente en ciertas plantas de Zingiberaceae, es conocido por su actividad antimicrobiana y analgésica.¹⁴ Compuestos de la familia Zingiberaceae como el gingerol, paradol, yakuchinone y curcumina, comparten estructuras similares, poseen una porción vainillin (4-hidroxi-3-metoxifenilo) y el grupo funcional cetona en su estructura.

¹³ Anand, P.; Thomas, S. G.; Kunnumakkara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Sung, B.; Tharakan, S. T.; Misra, K.; Priyadarsini, I. K.; Rajasekharan, K. N.; Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 1590-1611

¹⁴ Y.-J. Surh, K.-K. Park, K.-S. Chun, J.-M. Lee, E. Lee, S.S. Lee, Antitumor promoting activities of selected pungent phenolic substances present in ginger, *J. Environ. Toxicol. Pathol. Oncol.* **1999**, *18*, 131-139.

Semillas de *Aframomum melegueta* K. Schum (Zingiberaceae) poseen un amplio uso como especias, y en medicina tradicional.¹⁵ Se pueden aislar de ellas los agentes antimicobacterianos 6-paradol (1-[4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-3-decanona) y 6-shogaol.¹⁶ Se ha mostrado que estos compuestos poseen actividad contra *Mycobacterium chelonae*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* y *M. xenopi* (CIM 10-15 µg/ml). Estos dos compuestos han presentado los mismos niveles de actividad in vitro, lo que sugiere que el doble enlace conjugado con el grupo carbonilo no es significativamente importante para la actividad. El derivado de 6-paradol, que no posee metilos en su estructura, conservo la actividad antimicobacteriana y posee mayor actividad frente a *Candida albicans*, mientras que Gingerona se encontró inactivo. La metilación y acetilación de 6-paradol y 6-shogaol resultaron en disminución de la actividad. El acetato de 6-shogaol exhibió el mismo nivel de actividad contra cepas de *Mycobacterium* respecto a los compuestos parentales. La mayor actividad fue de un compuesto derivado del 6-paradol que posee dos grupos hidroxilo libres. Por lo que es probable que el grupo fenólico junto con la cadena alifática lateral contribuyen significativamente sobre la actividad antimicrobiana.¹⁷

Se han realizado estudios bioquímicos para comparar y evaluar el potencial quimiopreventivo del 6-paradol y sus derivados sintéticos, los 6-dehidroparadoles, obteniéndose resultados que indican que poseen un potencial quimiopreventivo del cáncer.¹⁸

Este tipo de esqueleto de los compuestos contribuye a la supresión de la proliferación de células cancerosas humanas mediante la inducción de la apoptosis. La longitud de la cadena alquílica parece no tener influencia en la citotoxicidad de compuestos de dehidroparadol que tienen un grupo funcional cetona α , β -insaturado en la cadena.¹⁹

¹⁵ Perry, L.M. *Medicinal plants of East and Southeast Asia*, The MIT Press, Boston, MA, 1980, 438.

¹⁶ Connell, D.W. and Sutherland, M.D. *Aust J. Chem.* 1970, 22: 1033-1043.

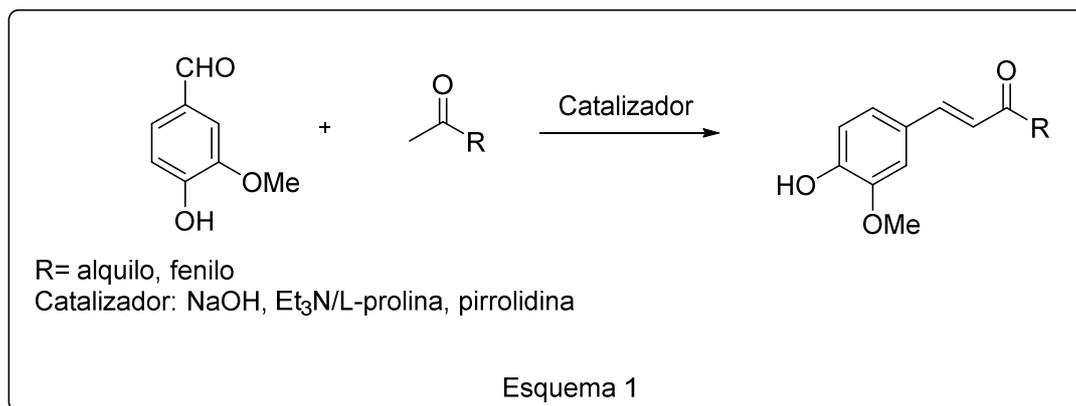
¹⁷ Galal, A.M. *Pharm. Biol.* 1996, 34 (1), 64-69.

¹⁸ Chung, W-Y; Young, Y; Surh, Y.; Lee, S.; Park, S. *Mut. Res./Gen. Tox. And Env. Mut.* 2001, 496 (1-2), 199-206.

¹⁹ Keum, J.; Kim, J.; Lee, K; Park, K.; Surh, Y.; Lee, J.; Lee, S.; Yoon, J.; Joo, S.; Cha, I.; Yook, J. *Canc.Lett.* 2001, 177 (1), 41-47.

2.6. DISEÑO SINTÉTICO

Para obtener los dehidroparadoles se empleó la reacción de condensación aldólica de las diferentes cetonas con la vainillina (aldehído aromáticos que contiene la función hidroxilo y metoxilo en su estructura) (Esquema 1). Como catalizadores de la reacción, se utilizaron NaOH, Et₃N/L-Prolina y pirrolidina.



Con el objetivo de determinar la actividad biológica de los compuestos sintetizados en el presente trabajo se analizan los mismos como inhibidores de diferentes isozimas de la anhidrasa carbónica, tanto humana como las presentes en *Mycobacterium tuberculosis*, así como también se realizaran ensayos frente a la micobacteria.

3. EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos utilizados

Los puntos de fusión fueron determinados en capilares cerrados en un equipo Buchi-Tottoli y no fueron corregidos.

Para la realización de cromatografía en capa delgada se emplearon cromatofólios de silicagel Merck 60 F254.

Los productos que no fueron visibles al UV se revelaron por método destructivo sumergiendo la placa en una solución de H₂SO₄ al 10% metanol, y posteriormente se calentó a la llama.

Las cromatografías en columna fueron realizadas utilizando silicagel MN Kieselgel 60 Riedel-de Haen (230-400 mesh).

Los espectros de ¹H-RMN, ¹³C RMN fueron determinados utilizando un equipo Bruker Avance III 600 MHz.

Solventes y reactivos

Los productos comerciales cuyo origen se indican a continuación, fueron purificados si era necesario utilizando técnicas generales de laboratorio.²⁰

Acetato de etilo, Anedra, p.e. 77°C. Se secó con K₂CO₃ y se realizó destilación fraccionada.

Acetofenona, Anedra

Acetona, Anedra

Ácido acético, Carlo Erba

Ácido acético glacial, Anedra

²⁰ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals", Third Ed. **1988**. Pergamon Press.

Ácido clorhídrico, Merck p.a.

Ácido sulfúrico, Merck p.a. (95-97%)

Benceno, Biopack

4-bromoacetofenona, Aldrich

Butanona, Sintorgan, p.e. 78-79 °C

Cloroformo, Merck p.a.

Cloruro de Sodio, Anedra p.a.

Diclorometano, Anedra, p.e. 40°C. Se secó con CaCl_2 y se destiló de forma simple desde P_2O_5

Etanol, Soria (96%)

Éter, Cicarelli

4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído, Aldrich, p.f. 80-83°C. Se recristalizó desde agua.

Hidróxido de potasio, Biopack

Hidróxido de sodio, Fluka

Metanol anhidro, Anedra, p.e. 65°C. Se secó con P_2O_5 y se realizó destilación simple.

Metil isobutil cetona, Sintorgan

Metil isopropil cetona, E. Kodak, p.e. 93-95°C

n-Hexano, Anedra, p.e. 69°C. Se secó con Na_2SO_4 y se realizó una destilación simple.

Pirrolidina, Fluka p.a.

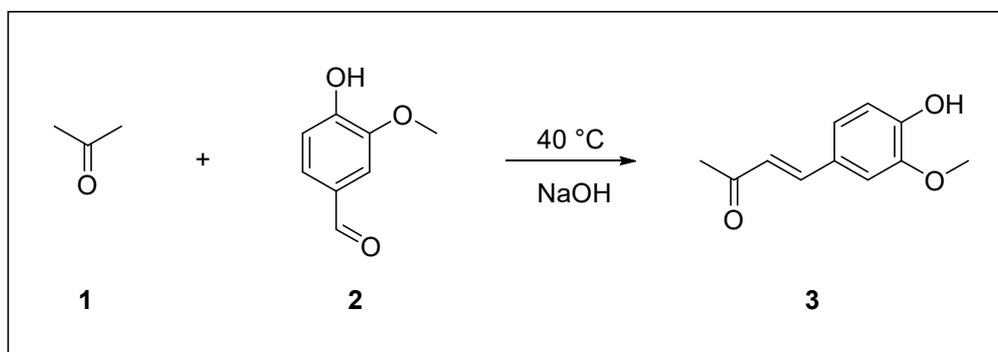
Prolina, Fluka

Sulfato de sodio, Fluka

Trietilamina, Merck p.a.

3.2. SÍNTESIS DE DEHIDROPARADOLES

Síntesis de (*E*)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (**3**)



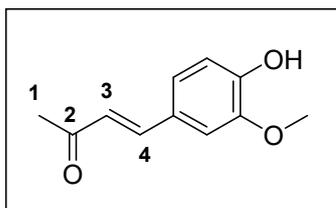
En un balón con bazo magnético se colocó 76,1 mg (0,5 mmol), de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**) se adicionó 100 ml de acetona (**1**) y luego 200 ml de H₂O destilada.

Se preparó una solución de NaOH al 3%, y se agregó 8,0 ml a la mezcla de reacción gota a gota. Se dejó reaccionar en baño a temperatura 40°C. La mezcla de reacción presentó coloración verde claro. Se siguió el avance de la reacción mediante cromatografía en capa delgada (CCD), se evidenció desaparición del reactivo de partida transcurridas 48 h.

El exceso de acetona (**1**) de la mezcla de reacción fue eliminado mediante evaporador rotativo. Luego se añadió 2,5 ml HCl 10%, sobre baño de hielo, hasta pH=6. Se observó disminución de la coloración.

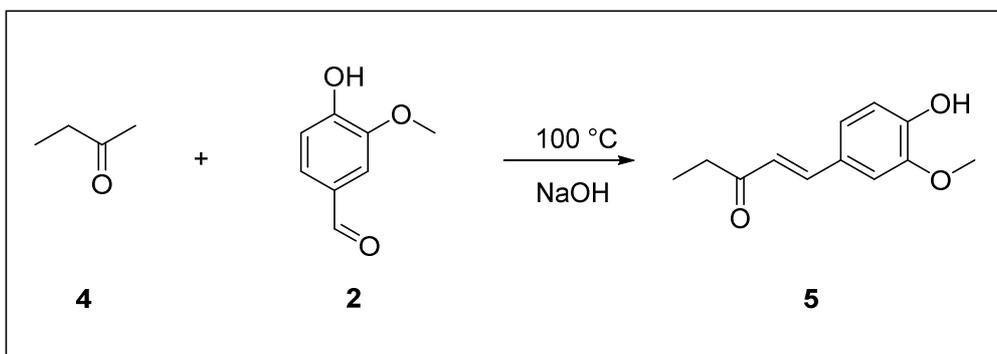
Posteriormente se realizaron extracciones con acetato de etilo (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄. Se llevó nuevamente a evaporador rotatorio para eliminar el solvente. El producto fue purificado mediante recristalización desde hexano-acetato de etilo (9:1). El producto **3** se secó en bomba de vacío hasta peso constante. El rendimiento obtenido fue del 63%.

(E)-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)but-3-en-2-ona (3)



Sólido blanco. Pf 122 - 122.5 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9,85 (sa, 1H, OH), 7,47 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-4), 7,10 (m, 3H, ArH), 6,95 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, ArH), 6,61 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, H-3), 3,95 (s, 3H, CH_3O), 2,39 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 198,44 (C-2), 148,28 (ArC), 146,89 (ArC), 143,77 (C-4), 126,92 (ArC), 124,99 (C-3), 123,52 (ArC), 114,83 (ArC), 109,33 (ArC), 55,97 (CH_3O), 27,31 (CH_3).

Intento de síntesis de (E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)pent-1-en-3-ona (5)

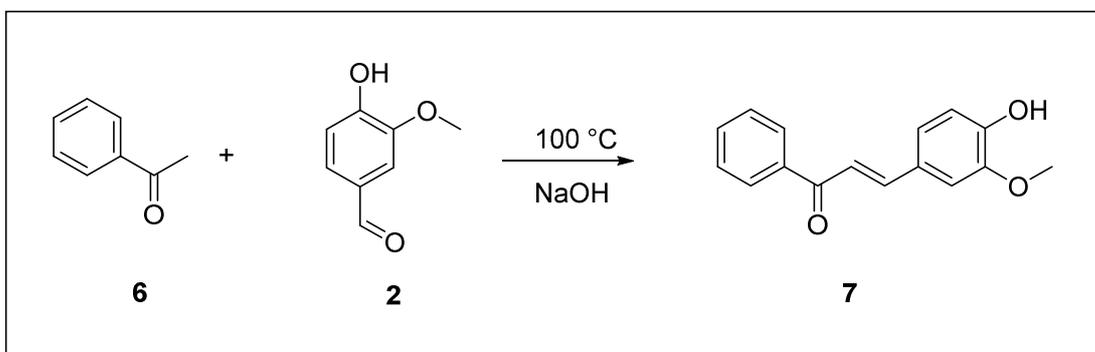


Se pesó 761 mg (5 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**) en un tubo de reacción con buzo magnético, luego se añadió 1080 mg (15 mmol) de butanona (**4**) y finalmente 2,50 ml de NaOH al 10%, se observó coloración amarilla y una emulsión blanca en el fondo del tubo. Se dejó reaccionar en un baño de silicona a 100°C. Con el aumento de temperatura se observaron cambios en la coloración de naranja a rojo oscuro. El avance de la reacción se siguió por CCD, hasta observar que se consumió el reactivo de partida a las 9,5 h. Se observó la presencia de un sólido negro.

Se llevó a pH=7 agregando 1,7 ml de HCl 10%, sobre baño de hielo. La mezcla de reacción vierte sobre 50 ml de H_2O .

Se intentó extraer con acetato de etilo, formándose una emulsión y precipitado de color negro. Evidenciando la descomposición del producto por esta vía.

Síntesis de (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (**7**)

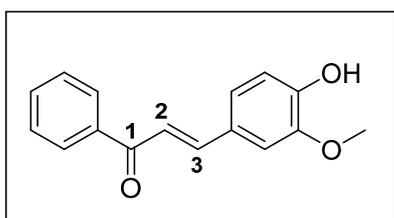


En un balón con un buzo magnético, se pesó 1,5220 g (10 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**). Luego se agregó 1,20 ml (10 mmol) de acetofenona (**6**) con agitación magnética, por último se añaden 1,12 g (20 mmol) de NaOH disueltos en 100 ml etanol. La mezcla presentó coloración amarilla al inició, transcurridos pocos minutos pasó a color anaranjado. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por CCD hasta observar que se consumió el reactivo de partida, luego de 96 h.

Se vertió la mezcla de reacción sobre 50 ml de H₂O fría, luego se adicionó HCl al 10 % sobre baño de hielo, hasta pH=7, controlado con papel indicador. Se llevó a evaporador rotativo para eliminar el etanol. Luego se realizaron extracciones con acetato de etilo (4 x 20 ml). Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄. Se filtró y se evaporó el solvente en evaporador rotativo.

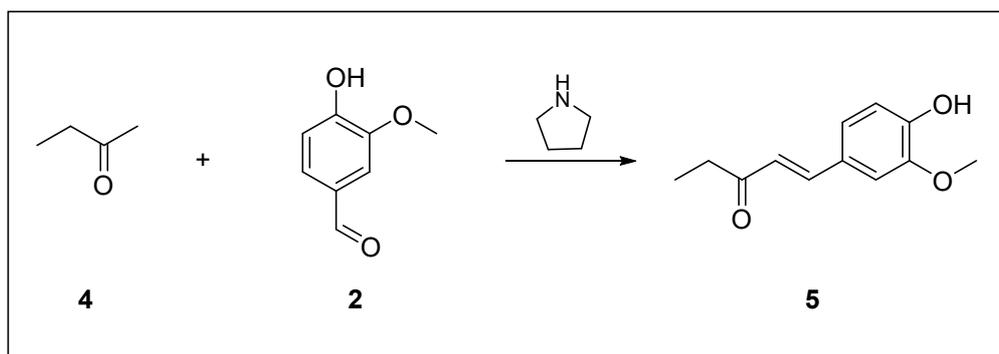
El producto crudo se purificó por cromatografía en columna de sílica gel utilizando inicialmente CH₂Cl₂ como solvente de elución y luego se aumentó la polaridad utilizando la mezcla CH₂Cl₂-CH₃OH 9:1. El rendimiento fue del 60 %.

(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (7)



Sólido gomoso amarillo. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9.84 (sa, 1H, $J = 1.4$ Hz, OH), 7.77 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H-3), 7.59 (m, 1H, ArH), 7.52 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, ArH), 7.44 (dd, 1H, $J = 6.0, 1.7$ Hz, ArH), 7.40 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz, H-2), 7.28 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, ArH), 7.23 (dd, 1H, $J = 8.3, 1.8$ Hz, ArH), 7.15 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, ArH), 7.06 (dd, 1H, $J = 8.5, 1.5$ Hz, ArH), 6.98 (dd, 1H, $J = 8.2, 1.4$ Hz, ArH), 3.98 (s, 3H, $J = 1.5$ Hz, CH_3O). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 190.91 (C-1), 151.72 (ArC), 148.35 (ArC), 147.18 (C-3), 145.30 (C-2), 138.49 (ArC), 132.58 (ArC), 129.88 (ArC), 128.57 (ArC), 128.44 (ArC), 127.53 (ArC), 123.42 (ArC), 119.82 (C-3), 114.41 (ArC), 108.81 (ArC), 56.12 (CH_3O).

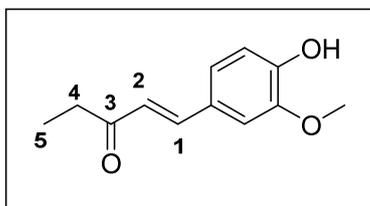
Síntesis de *(E)*-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)pent-1-en-3-ona (5)



En balón con un buzo magnético, se pesó 1,52 g (10 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**), se agregan 8 ml de tolueno y 3,5 ml de éter. Se dejó con agitación magnética durante un periodo de 1,5 h. El reactivo **2** se agregó gota a gota a un balón que contenía 0,83 ml (10 mmol) pirrolidina, 0,57 ml (10 mmol) de ácido acético y 0,89 ml (10 mmol) de butanona (**4**). Se dejó reaccionar con refrigerante y agitación magnética a temperatura ambiente. Se observó coloración naranja que luego se intensificó. El avance de reacción se controló por medio de CCD. Se dejó reaccionar 48 h. Luego se agregaron 15 ml de agua. Se añadió HCl al 10% hasta hasta $\text{pH}=6$, controlado con papel indicador. Se realizaron extracciones con H_2O (3 x 10ml). Se observó aparición de un sólido

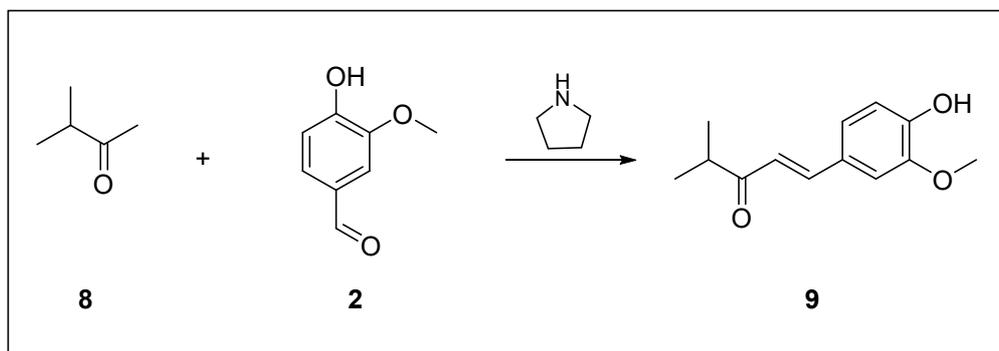
en la fase orgánica, fue filtrado por succión y secado en bomba de vacío hasta peso constante. El rendimiento obtenido fue del 79%.

(E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)pent-1-en-3-ona (5)



Sólido amarillo. Pf 81 - 82 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H-1), 7.09 (m, 2H, ArH), 6.94 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-2), 6.62 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, ArH), 3.94 (s, 3H, CH_3O), 2.70 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-4), 1.18 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, H-5). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 201.10 (C-3), 148.15 (ArC), 146.88 (ArC), 142.57 (C-1), 127.07 (ArC), 123.81 (C-2), 123.34 (ArC), 114.83 (ArC), 109.47 (ArC), 55.97 (CH_3O), 33.76 (C-4), 8.39 (C-5).

Síntesis de (E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-4-metilpent-1-en-3-ona (9)

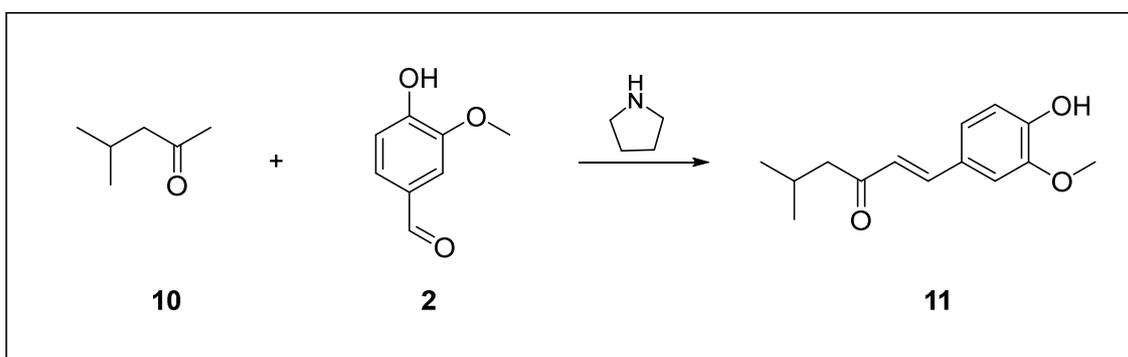


En un balón con un buzo magnético se pesó 1,5200 g (10 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**), se agregó 10,0 ml de tolueno y 5,0 ml de éter. El reactivo **2** se agregó gota a gota a un balón que contenía 0,83 ml (10 mmol) de pirrolidina, 0,57 ml (10 mmol) de ácido acético, y 1,07 ml (10 mmol) de metilisopropilcetona (**8**). La mezcla presentó coloración anaranjada, volviéndose bordo oscuro rápidamente.

El avance se siguió mediante CCD. La reacción se da por finalizada transcurridas 96 h. Se añadió sobre un balón que contiene 15,0 ml de H_2O , luego se agregó HCl al 10% hasta pH=6, controlado con papel indicador. Se agregó CH_2Cl_2 evidenciándose precipitación de un sólido oscuro. Se filtró por succión y se llevó

a peso constante. El producto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando CH_2Cl_2 como solvente de elución. El rendimiento obtenido fue del 82%. Sin embargo el producto se descompuso con la exposición a la luz, resultando ser fotolábil.

Síntesis de (*E*)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona (**11**)

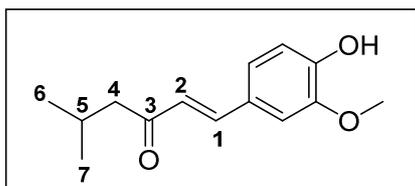


En un balón con un buzo magnético se pesó 1,52 gr (10 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (**2**), se añadió 10,0 ml tolueno y finalmente 5,0 ml de éter. El reactivo **2** se añadió gota a gota a un balón que contiene 0,83 ml (10 mmol) de pirrolidina, 0,57 ml (10 mmol) de ácido acético y 1,25 ml (10 mmol) de metil isobutil cetona (**10**). Se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente.

Se siguió el avance de la reacción por medio de CCD hasta observar que se consumió totalmente el reactivo a las 72 h. Se agregaron 15,0 ml de H_2O y luego HCl al 10% hasta $\text{pH}=6$, controlado con papel indicador. Luego se adicionó 10,0 ml de CH_2Cl_2 . Se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (3 x 5 ml). Se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 , se filtró y luego se llevó a evaporador rotativo para eliminar el solvente.

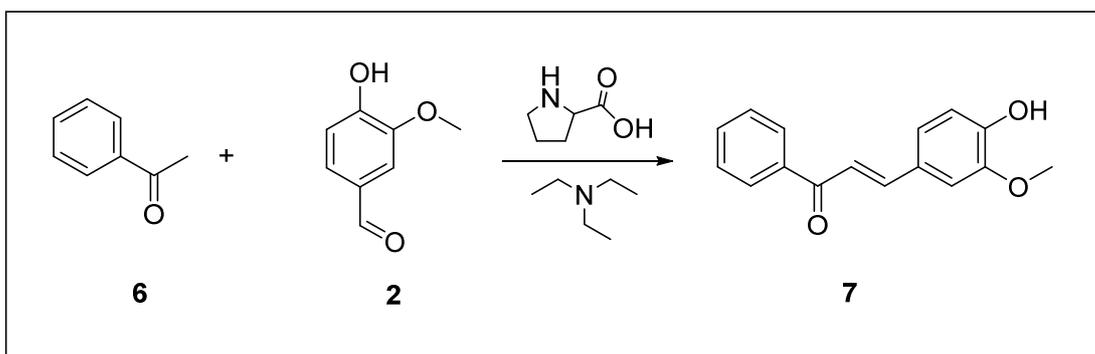
El producto **11** se purificó por medio de cromatografía en columna, utilizando como solvente de elución CH_2Cl_2 . Se obtuvo un rendimiento de 76%.

(E)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5-metilhex-1-en-3-ona (11)



Sólido gomoso rojo oscuro. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 9.85 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, OH), 7.49 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, H-1), 7.12 (dd, 1H, $J = 8.3, 1.8$ Hz, ArH), 7.07 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, ArH), 6.95 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-2), 6.62 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz, ArH), 3.95 (s, 3H, CH_3O), 2.54 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H-4), 2.25 (m, 1H, H-5), 1.00 (d, 6H, $J = 6.6$ Hz, H-6, H-7). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 200.42 (C-3), 148.16 (ArC), 146.86 (ArC), 142.73 (C-1), 127.09 (ArC), 124.48 (C-2), 123.38 (ArC), 114.82 (ArC), 109.47 (ArC), 55.97 (CH_3O), 49.69 (C-4), 25.39 (C-5), 22.74 (C-6,C-7).

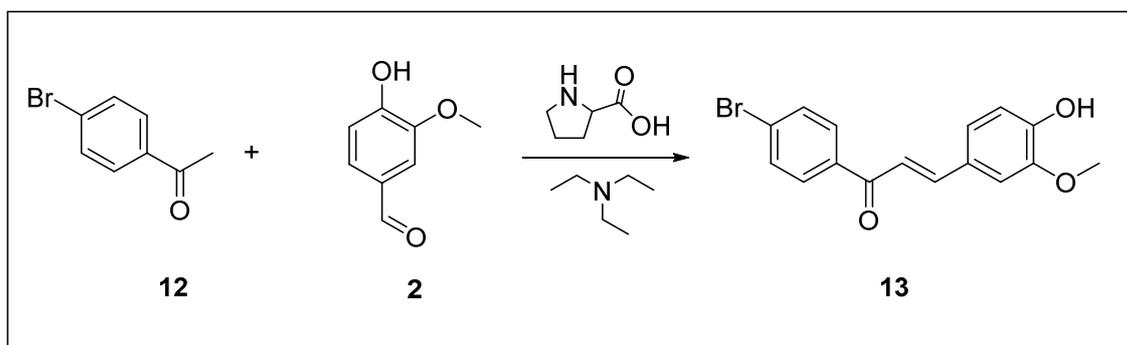
Síntesis de 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-fenil-prop-1-en-3-ona



En un balón con un buzo magnético se adicionó 0,5844 ml (5 mmol) de acetofenona (**6**) y 0,9132 g (6 mmol) de vainillina (**2**) y 10 ml de CH_3OH anhidro. Una vez homogenizada la mezcla de reacción, se agregó 0,1728 g (1,50 mmol) de prolina y luego 0,2090 ml (1,50 mmol) de trietilamina. Se dejó con agitación y a reflujo. El avance de la reacción se siguió por CCD, se dio por finalizada transcurridas 44 h, al observar consumo total del reactivo. El solvente fue eliminado mediante evaporador rotativo.

Se purificó mediante cromatografía en columna, usando como solvente de elución CH_2Cl_2 . El producto se secó con bomba de vacío hasta peso constante. El rendimiento fue del 70 %.

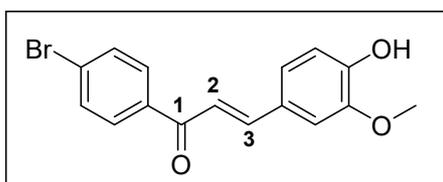
Síntesis de (*E*)-1-(4-bromofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**13**)



En un balón con un buzo magnético, se pesó 0,9952 g (5 mmol) de 4-bromoacetofenona (**12**) y 0,9132 g (6 mmol) de vainillina (**2**). Se disuelven en 10,00 ml de CH₃OH anhidro. Luego se agregó 0,1728 g (1,5 mmol) de prolina y por último 0,21 ml (1,5 mmol) de trietilamina, la mezcla de reacción tomó coloración naranja. Se dejó reaccionar con agitación magnética y a reflujo. Se siguió el avance de la reacción mediante CCD. Se dio por finalizada la reacción a las 72 h, evidenciándose la desaparición del reactivo de partida. Se evaporó el solvente mediante evaporador rotativo.

El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂ como solvente de elución. El rendimiento obtenido fue del 40 %.

(*E*)-1-(4-bromofenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**13**)



Sólido gomoso amarillo. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 9.85 (s, 1H, OH), 7.89 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, ArH), 7.77 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H-3), 7.66 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, ArH), 7.33 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, H-2), 7.24 (dd, 1H, *J* = 8.2, 2.0 Hz, ArH), 7.14 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, ArH), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, ArH), 3.99 (s, 3H, CH₃O). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 189.43 (C-1), 148.54 (ArC), 146.87 (ArC), 145.74 (C-3), 137.27 (ArC), 131.84 (2 x ArC), 129.94 (2 x ArC), 127.56 (ArC), 127.33 (ArC), 123.48 (ArC), 119.27 (C-2), 114.95 (ArC), 110.18 (ArC), 56.06 (CH₃O).

3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS DEHIDROPARADOLES FRENTE A LAS DISTINTAS ISOZIMAS DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA

La actividad de las isozimas de la anhidrasa carbónica fue medida a través de la reacción de hidratación del CO₂ en el grupo de trabajo del Dr. Claudiu Supuran, Universidad de Florencia. Para realizar el estudio de la actividad de la anhidrasa carbónica a través de la hidratación del CO₂ se utilizó un equipo de flujo detenido (stopped-flow) Applied Photophysics mediante la metodología reportada por Khalifah.²¹ Se empleó rojo de fenol (a una concentración de 0.02 mM) como indicador, trabajando a una absorbancia máxima de 557 nM, empleando 20 mM de Hepes (pH 7.5) como buffer y 20 mM de Na₂SO₄ (para mantener la fuerza iónica), siguiéndola velocidad inicial de la reacción de hidratación del CO₂ catalizada por la anhidrasa carbónica por un período de 10-100 s. La concentración de CO₂ para las determinaciones varió de 1.7 a 17 mM. La velocidad de la reacción no catalizada fue determinada de la misma manera y se sustrajo de las velocidades observadas. Las soluciones stock del inhibidor (0.1 mM) fueron preparadas en agua destilada y las diluciones hasta 0.01 nM fueron realizadas también con agua destilada. Las soluciones de inhibidor y de las enzimas fueron preincubadas conjuntamente por 15 min a temperatura ambiente previamente al ensayo. Las constantes de inhibición (K_i) fueron obtenidas mediante la ecuación de Cheng-Prusoff²² y son el resultado de tres determinaciones diferentes.

²¹ Khalifah, R. G. *J. Biol. Chem.* **1971**, 246 (8), 2561–2573.

²² Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22 (23), 3099–3108.

Tabla 1. Datos de inhibición de los diferentes dehidroparadoles frente a las anhidrasas carbónicas humanas I, II, IX, XII y a la mtAC 3, presente en *Mycobacterium Tuberculosis*.^a

Comp.	K _i ^b (μM)				
	AC I	AC II	AC IX	AC XII	mtAC 3
3	86.3	>10000	24.0	3.2	0.26
7	76.3	96.4	29.1	0.63	0.70
5	>10000	>10000	32.0	2.5	0.25
11	>10000	>10000	26.3	1.7	0.19
13	92.6	82.0	>10000	6.4	0.38
AZZ^c	0.25	0.012	0.025	0.006	0.10

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia.

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes.

c) Acetazolamide, inhibidor estandar.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA

Las determinaciones fueron realizadas por el grupo del Dr. Ricardo Morbidoni, Universidad Nacional de Rosario. Las cepas utilizadas fueron *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG cepa Pasteur y *M. DeltaRD1*. El medio de cultivo utilizado fue Middlebrook 7H9 Difco suplementado con 1/10 v/v de ADS, glicerol (1% p/v). Los cultivos fueron desarrollados a 37°C bajo agitación. Ensayos de actividad antibacteriana: se prepararon soluciones patrón de todos los compuestos analizados en DMSO a una concentración de 10 mg/mL. Luego las soluciones fueron diluidas con el medio de cultivo a una concentración de 400 μg/mL. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se definió como la concentración más baja que previene el crecimiento de la micobacteria, observado visualmente.

Tabla 2. Ensayos de actividad antibacteriana, valores de CIM en μg/mL.

CEPA	DEHIDROPARADOL				
	3	7	5	11	13
BCG	200	50	25	25	25/12.5
DR1	200	25	50	50	100
37	200	100	100	100	25

4. DISCUSIÓN

4.1. SÍNTESIS DE LOS DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE VAINILLINA

4.1.1. Condensación aldólica

Para obtener los dehidroparadoles se empleó la reacción de condensación aldólica de las diferentes cetonas con la vainillina (aldehído aromático que contiene la función hidroxilo y metoxilo en su estructura) (Esquema 2). Como catalizadores de la reacción, se utilizaron NaOH, Et₃N/L-Prolina y pirrolidina, cuyo uso se encuentra descrito en la bibliografía para reacciones similares. En la Tabla 3 pueden observarse los resultados obtenidos con los diferentes compuestos carbonílicos empleados.

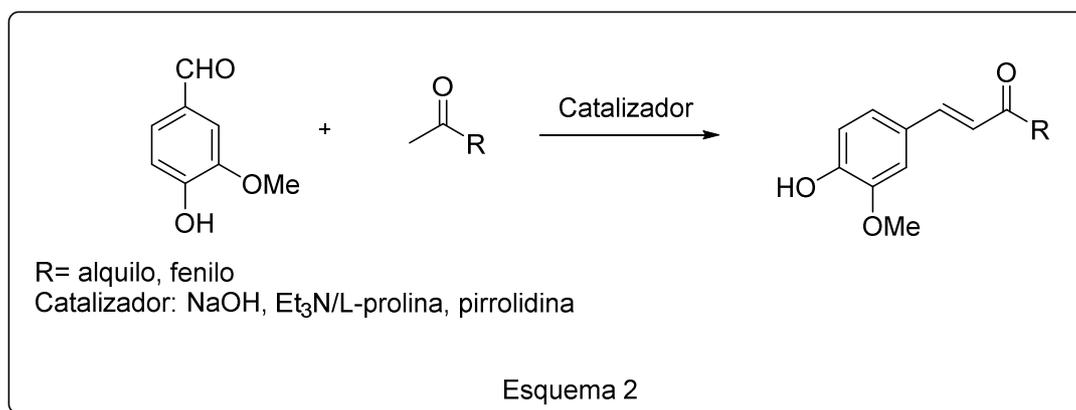


Tabla 3. Síntesis de Dehidroparadoles

Aldehído	Cetona	Cat.	Tiempo reacción (h)	Producto	Rend. (%)
Vainillina	Acetona	NaOH	48	3	63
	Butanona	NaOH	19,5	5	SR
		Pirrolidina	48		79
	Acetofenona	NaOH	96	7	60
		Prolina-TEA	44		70
	Metil isopropil cetona	Pirrolidina	96	9	86
	Metil isobutil cetona	Pirrolidina	72	11	76
	4-Bromoacetofenona	Prolina-TEA	72	13	40

4.2. DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE CETONAS ALIFÁTICAS

4.2.1. NaOH como catalizador

Los dehidroparadoles **3** y **5** (Esquema 3) fueron sintetizados a partir de la reacción de condensación aldólica entre la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) y distintas cetonas (ver Tabla 3). Se utilizó NaOH como catalizador, el cual había sido descrito en bibliografía en reacciones similares.²³

El dehidroparadol **3**, derivado de la acetona se obtuvo por este método con buen rendimiento. Sin embargo, el producto **5** se intentó sintetizar por la misma vía, sin éxito. Se observó la presencia de un sólido y transcurridas 43 h., se da por finalizada la reacción, sin ver avance de la misma. Se intentó el aislamiento pero, luego de la neutralización, se produjo la aparición de una emulsión negra que no fue posible separar.

4.2.2. Pirrolidina como catalizador

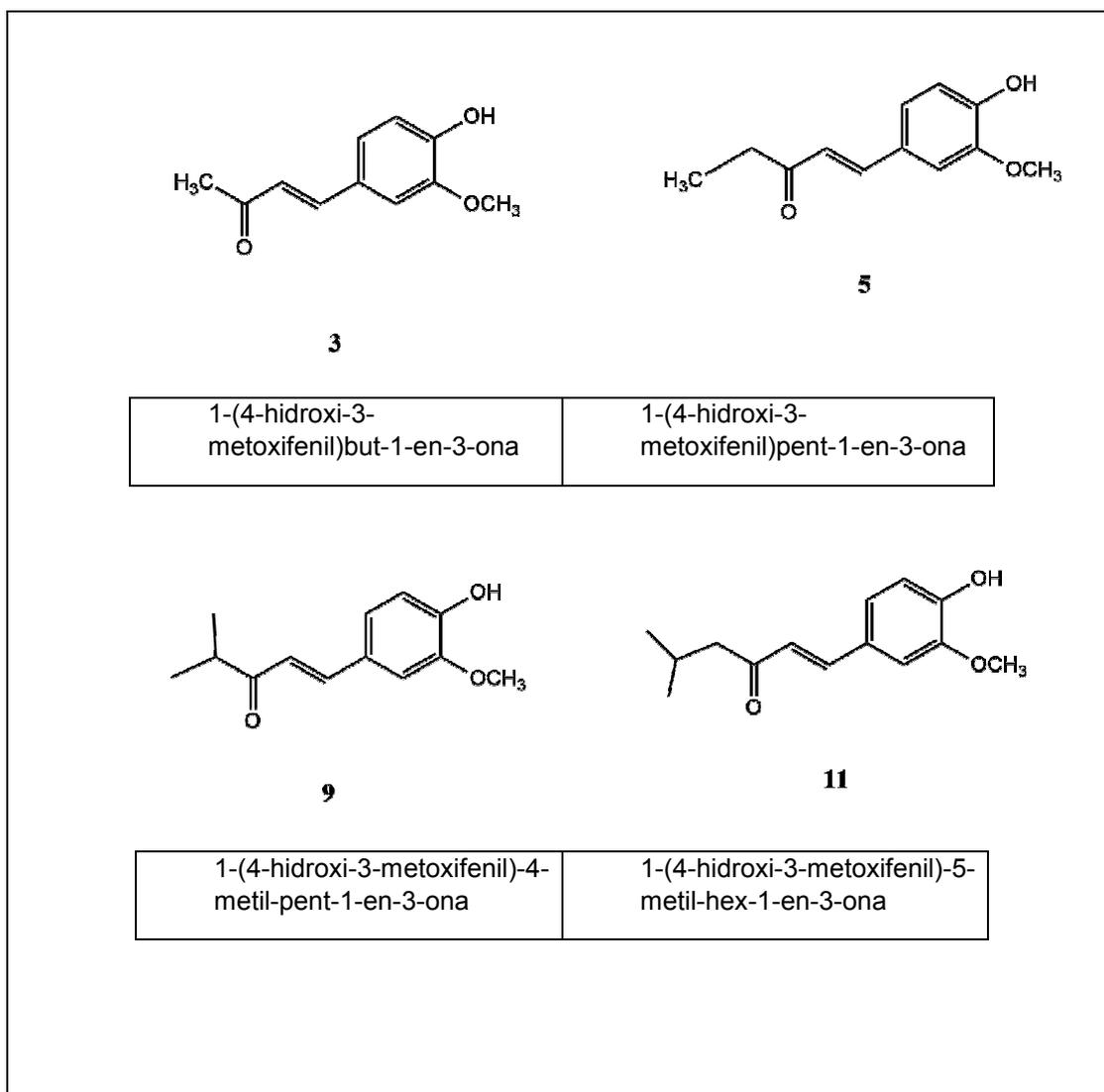
Se obtuvieron los productos **5**, **9** y **11** (Esquema 3) mediante la utilización de pirrolidina como catalizador.²⁴

La vainillina fue disuelta y adicionada a la cetona correspondiente, junto con ácido acético y pirrolidina y la mezcla se colocó a reflujo. Los tiempos de reacción y rendimientos se encuentran en la Tabla 3.

Durante el aislamiento de **5**, mediante extracción líquido-líquido se obtuvo un precipitado, el cual fue purificado por medio de cromatografía en columna, confirmándose por resonancia magnética nuclear que correspondía al producto. Finalmente el producto **5** purificado, se descompuso con la presencia de la luz, concluyendo que el mismo resultó ser foto lábil.

²³ Gaoa, M; Yin, G.; Wang, Z.; Wu, Y.; Guo, C.; Pan, Y.; Wu, A. *Tetrahedron* **2009**, 65 (31), 6047-6049.

²⁴ Locksley, H.; Rainey, D.; Rohan, T. *J. Chem. Soc.* **1972**, 3001-3006



Esquema 3. Dehidroparadoles con cadena alifática en su estructura

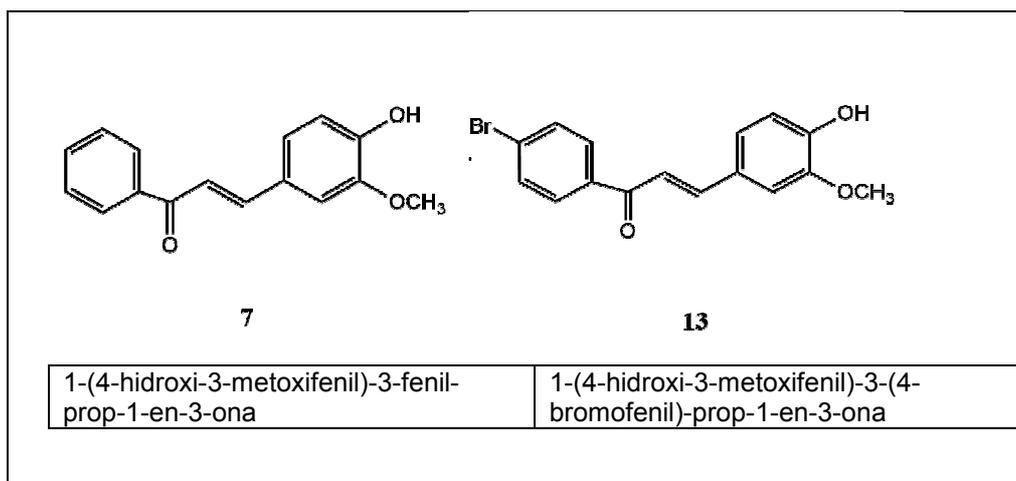
4.3. DEHIDROPARADOLES DERIVADOS DE ACETOFENONA

4.3.1. NaOH como catalizador

Para la preparación de la enona **7** (Esquema 4) se utilizó un método reportado en bibliografía²³, siendo optimizado para el caso de nuestras reacciones en particular, empleando una solución etanólica de hidróxido de sodio.

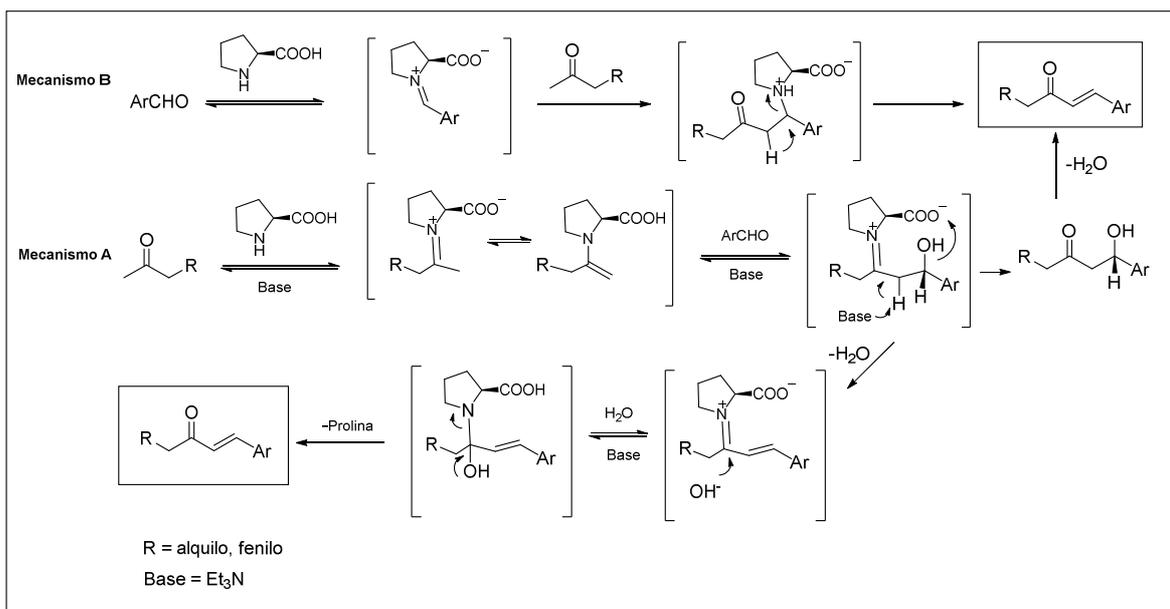
4.3.2. L-prolina-Et₃N como catalizador

Los dehidroparadoles **7** y **13** también fueron obtenidos empleando L-prolina-Et₃N como catalizador. En el caso del compuesto **7** el mismo fue obtenido con mejor rendimiento y con menores tiempo de reacción al comparar la misma reacción pero utilizando hidróxido de sodio como catalizador.



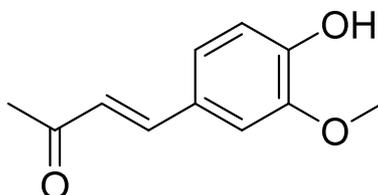
Esquema 4. Dehidroparadoles obtenidos a partir de cetonas con grupo aromáticos

En las reacciones empleando L-Prolina/Et₃N como catalizador, el mecanismo probable (Esquema 5) para la formación de los dehidroparadoles podría involucrar la formación de una enamina intermedia que posteriormente reacciona con el aldehído aromático para generar el ion iminio, el cual luego por deshidratación genera el correspondiente producto (Mecanismo A). Otra posibilidad podría darse mediante la formación de una imina y que, luego, se produzca la reacción con la cetona correspondiente, generando el dehidroparadol (Mecanismo B).



Esquema 5. Mecanismo probable de formación de los dehidroparadols

4.4. ANÁLISIS DE LOS DEHIDROPARADOLS OBTENIDOS EMPLEANDO ¹H y ¹³C RMN



Dehidroparadol **3**

Dada la similitud de los compuestos analizados, se describirán los espectros de resonancia magnética nuclear del dehidroparadol **3**, tomándolo como modelo. En el espectro de ¹H RMN (Figura 3) es posible observar un singlete ubicados alrededor de 2 ppm que integran para 3 hidrógenos, que se corresponden con el metilo de la cadena alifática, debido a su ubicación y a la estructura de la molécula. Luego se observa a 3.95 ppm otro singlete, que también integra para 3 protones, estos son los del metilo del grupo -OCH₃.

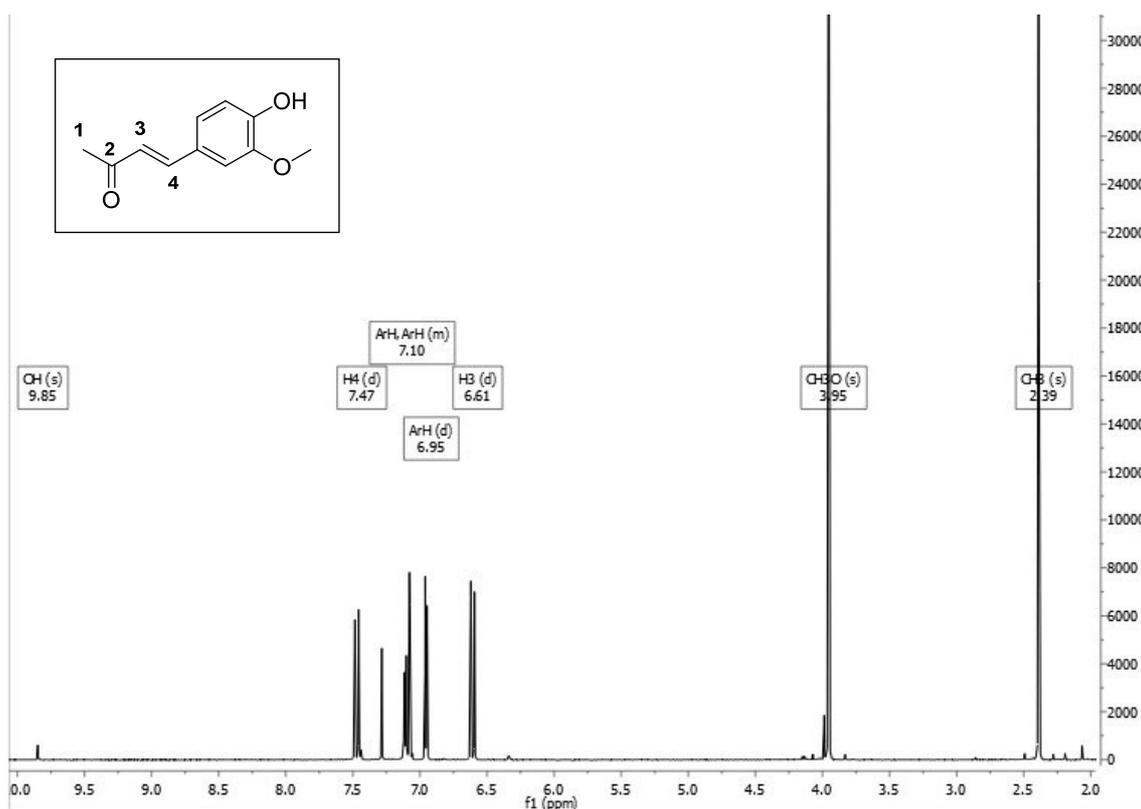


Figura 3. Espectro de ¹H RMN del dehidroparadol 3.

Continuando con el análisis en la zona de 7 ppm encontramos los protones correspondientes al anillo aromático y además dos dobletes con una constante de acoplamiento de 16,2 Hz (6,61 ppm y 7,47 ppm) que corresponde a los hidrógenos olefínicos H-3 y H-4. El valor de 16,2 Hz muestra que el doble enlace exhibe la conformación *trans*.

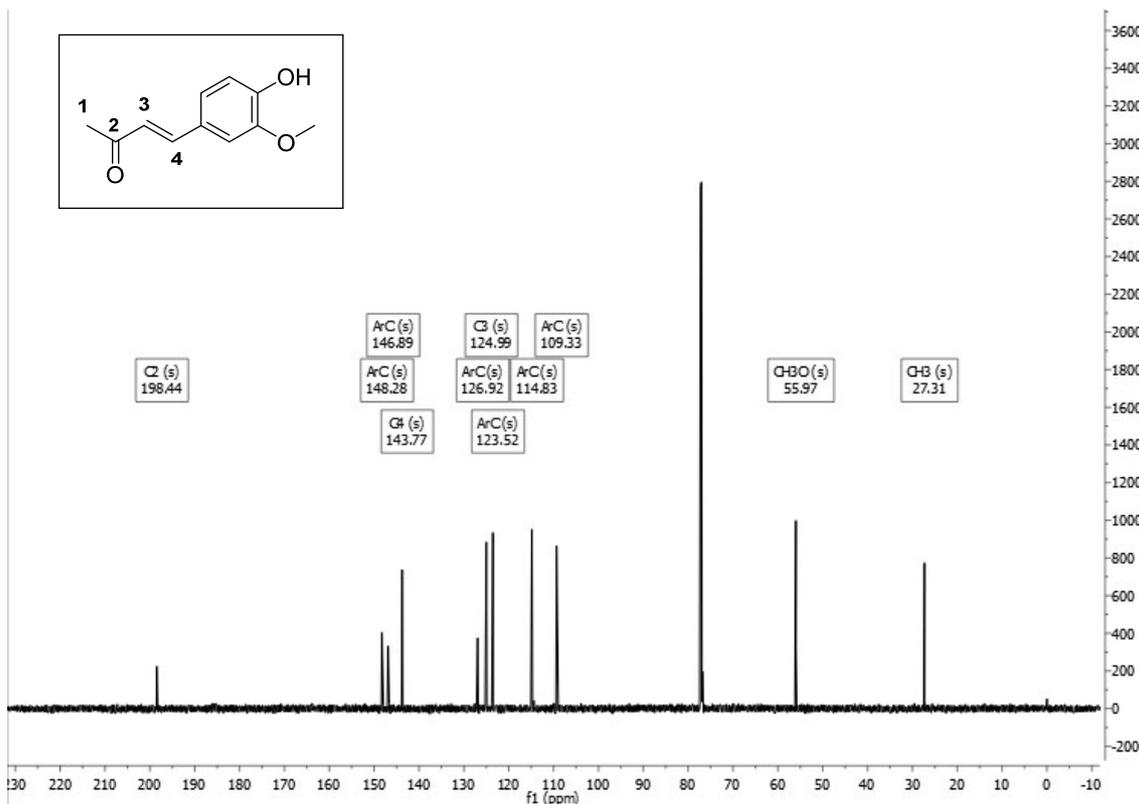


Figura 4. Espectro de ^{13}C RMN del dehidroparadol **3**.

Otra señal interesante es el singlete a 9,85 ppm que como puede observarse en el espectro de correlación HSQC (Figura 6), no tiene ningún carbono asociado por lo cual debe tratarse del correspondiente al OH fenólico.

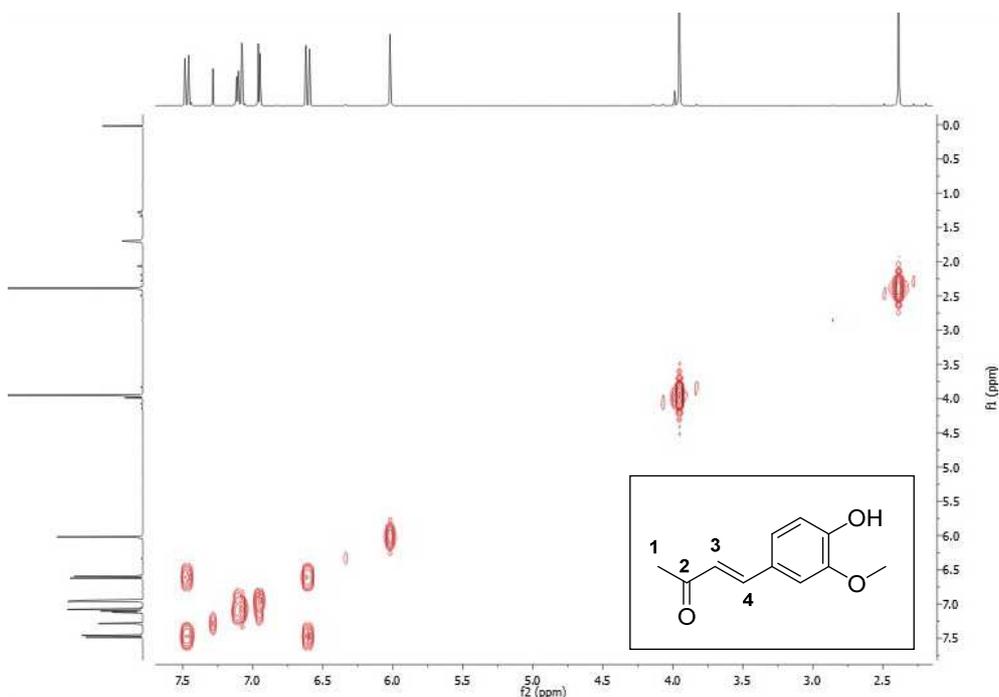


Figura 5. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del dehidroparadol **3**.

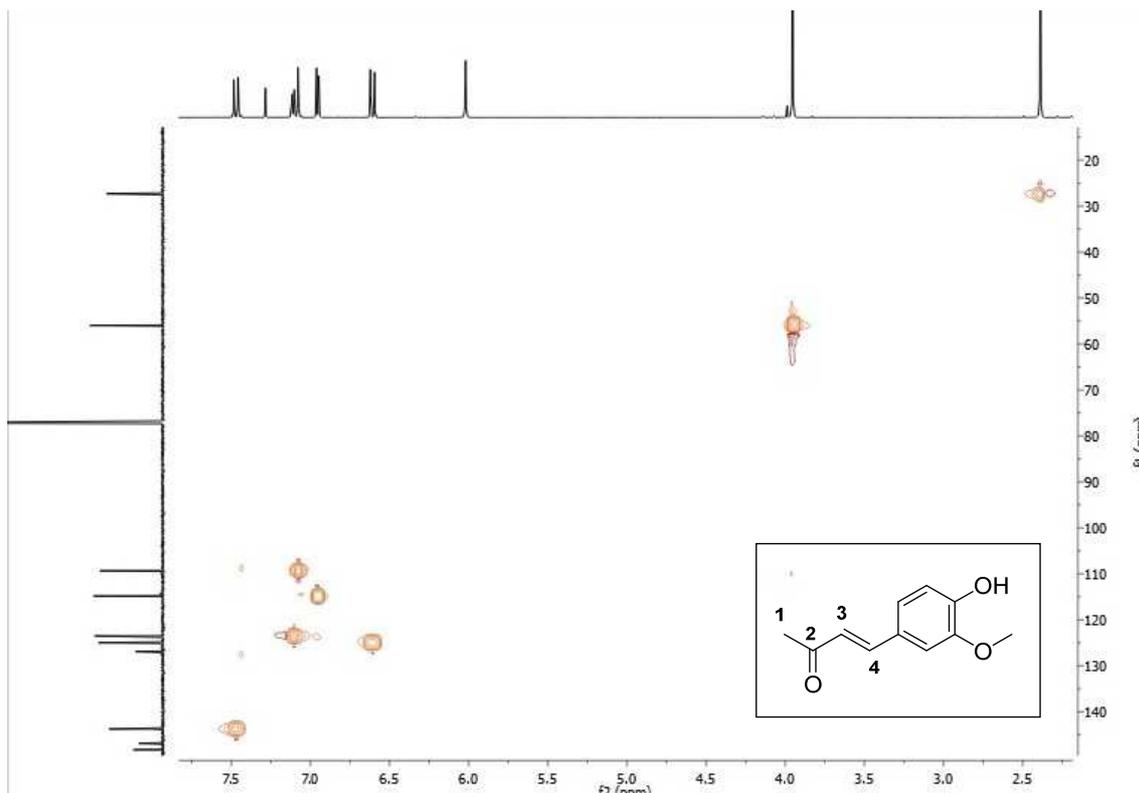


Figura 6. Espectro de correlación heteronuclear (HSQC) del dehidroparadol **3**.

Cabe mencionar que utilizando el espectro homonuclear COSY (Fig. 5) se confirmó la asignación de los diferentes protones de la molécula, así como también con el espectro de correlación HSQC (Fig. 6) se completó la asignación de los distintos carbonos que presenta la molécula.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS DEHIDROPARADOLES FRENTE A LA ANHIDRASA CARBÓNICA

La actividad de las isozimas de la anhidrasa carbónica fue medida a través de la reacción de hidratación del CO₂ en el grupo de trabajo del Dr. Claudiu Supuran, Universidad de Florencia. Se expuso a la anhidrasa carbónica a diferentes concentraciones del inhibidor para determinar la constante de inhibición correspondiente (K_i).

En la Tabla 4 se observan los datos de inhibición de las anhidrasas carbónicas humana (hAC I, II, IX y XII) y de la isoforma presente en *Mycobacterium*

tuberculosis (mtAC 3). Estas determinaciones fueron llevadas a cabo analizando la hidratación del CO₂ catalizada por las diferentes isoformas de la anhidrasa carbónica en presencia de los compuestos sintetizados y comparando la velocidad de la misma con la encontrada sin el agregado de los dehidroparadoles. Es importante destacar que cuanto menor sea el valor de la constante inhibitoria encontrada (K_i) mayor es la actividad de los compuestos estudiados.

Tabla 4. Datos de inhibición de los diferentes dehidroparadoles frente a las anhidrasas carbónicas humanas I, II, IX, XII y a la mtAC 3, presente en *Mycobacterium Tuberculosis*.^a

Comp.	K_i^b (μ M)				
	AC I	AC II	AC IX	AC XII	mtAC 3
3	86.3	>10000	24.0	3.2	0.26
7	76.3	96.4	29.1	0.63	0.70
5	>10000	>10000	32.0	2.5	0.25
11	>10000	>10000	26.3	1.7	0.19
13	92.6	82.0	>10000	6.4	0.38
AZZ^c	0.25	0.012	0.025	0.006	0.10

a) Determinaciones realizadas por el Dr. C. T. Supuran, Universidad de Florencia, Italia.

b) Errores en el rango del 5-10 % del valor reportado, de 3 determinaciones diferentes.

c) Acetazolamide, inhibidor estandar.

Analizando la Tabla 4 podemos observar que para el caso de la anhidrasa carbónica humana I y II la serie de dehidroparadoles sintetizados no tienen resultados significativos en la actividad inhibitoria. La situación es totalmente distinta en el caso de las isozimas IX y XII (asociadas a procesos tumorales), para las cuales se puede observar un buen perfil inhibitorio, mostrando para la XII una inhibición en un rango micromolar. Si bien la información proporcionada es útil para interpretar el comportamiento que presentan los compuestos sintetizados frente a las isozimas de la anhidrasa carbónica, un dato de mayor utilidad a la hora de analizar el diseño de inhibidores de estas enzimas es la selectividad que presentan frente a las isozimas IX y sobre todo la XII. Por otro lado, podemos observar que tanto para la mtAC 3 los compuestos sintetizados exhiben un muy buen perfil inhibitorio incluso comparable con el de la AAZ,

siendo **7** y **13**, ambos derivados de la acetofenona, lo cual nos da la pauta que la presencia de un anillo aromático en el dehidroparadol puede ser responsable de que la inhibición mejore.

Con respecto a la selectividad se puede observar en la tabla 4 que los compuestos sintetizados muestran ser más selectivos para las ACs IX, XII y mtAC 3 sobre la I y II, por lo tanto esto conduce a una preferencia para la inhibición de esta clase de ACs. La selectividad es clave para el diseño de inhibidores, y como se observa que varios compuestos muestran un mejor perfil de inhibición de las dichas ACs, esto proporciona una oportunidad de explorar la unión de dicha porción para el desarrollo de potentes inhibidores selectivos derivados de dehidroparadoles.

En base a este análisis podemos decir, que el compuesto **7**, presenta las mejores características como inhibidor selectivo de las AC IX, XII y mtAC 3, y el dehidroparadol **11** frente a la AC XII y mtAC 3.

Siendo un hecho destacable que los compuestos sintetizados presentan una muy buena actividad frente a la mtAC 3, la cual, recordemos, es esencial para el crecimiento de la bacteria, se decidió estudiar la actividad de los compuestos sintetizados frente a la *Mycobacterium tuberculosis*.

4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA

Las determinaciones fueron realizadas por el grupo del Dr. Ricardo Morbidoni, Universidad Nacional de Rosario. Las cepas utilizadas fueron *M. tuberculosis* H37Rv (37), *M. bovis* BCG cepa Pasteur (BCG) y *M. DeltaRD1* (DR1).

Tabla 5. Ensayos de actividad antibacteriana, valores de CIM en µg/mL.

CEPA	DEHIDROPARADOL				
	3	7	5	11	13
BCG	200	50	25	25	25/12.5
DR1	200	25	50	50	100
37	200	100	100	100	25

De los datos obtenidos pueden observarse valores de CIM más elevados para los dehidroparadoles derivados de cetonas alifáticas, **3**, **5**, siendo una excepción **11**, que contiene el grupo isopropilo en su estructura. En cambio, los compuestos **7** y **13** (derivados de la acetofenona) con un sustituyente aromático, mostraron menores valores de concentración inhibitoria mínima. Dentro de los compuestos sintetizados, el dehidroparadol **13** (derivado de 4-bromoacetofenona) el que presenta la mejor actividad para dos de las tres cepas evaluadas.

Estos resultados ponen en evidencia que la cadena alifática ramificada mejora los resultados de actividad, a diferencia de las cadenas alifáticas lineales. Siendo también el compuesto **11** el que mejor actividad inhibitoria presentaba frente a la isozima presente en la micobacteria.

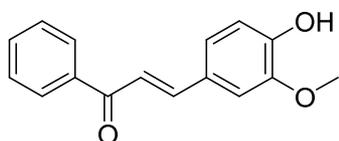
Por otro lado, podemos decir que existe una relación entre la actividad antimicobacteriana y la presencia de un sustituyente aromático, como es el caso del compuesto **13**, siendo un factor que la potencia notablemente, quedando en evidencia con los resultados expuestos anteriormente. Este compuesto, además presenta buena actividad inhibitoria de la mtAC 3 pero baja selectividad. Además, puede observarse que 4 de los compuestos sintetizados presentan buena actividad frente a otras cepas de micobacterias lo cual abre el espectro de posibilidades terapéuticas de los compuestos sintetizados.

5. CONCLUSIONES

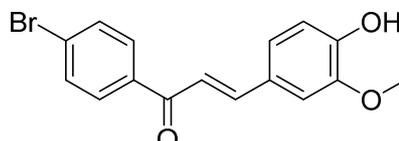
Como conclusión del trabajo desarrollado es posible mencionar que:

- ❖ Se han sintetizado 6 dehidroparadoles derivados de la vainillina.
- ❖ Se han estudiado distintas condiciones para dichas reacciones, variando el catalizador y la temperatura.
- ❖ Se ha realizado el análisis de los compuestos sintetizados mediante ^1H y ^{13}C RMN permitiendo confirmar las estructuras propuestas para los mismos.
- ❖ En colaboración con otros grupos de investigación se ha estudiado la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados frente a la anhidrasas carbónicas II, IX y XII humana, y la β -mtAC 3 de la *Mycobacterium tuberculosis*; y frente a la micobacteria.

Por lo tanto se pudieron optimizar las condiciones de reacciones para la obtención de los diferentes dehidroparadoles deseados mediante la condensación aldólica. Otro hecho interesante es que se ha podido medir la actividad inhibitoria frente a las diferentes anhidrasas carbónica hAC I, II, IX y XII y de la mtAC 3, encontrándose que los dehidroparadoles derivados de la acetofenona presentan las mejores características como inhibidores selectivos de las isozimas IX, XII y mtAC 3. Observando que el compuesto derivado de la acetofenona sin sustituir (**7**) presenta las mejores características como inhibidor selectivo de las ACs IX, XII y mtAC 3. En cambio el derivado de la 4-bromoacetofenona (**13**) es más selectivo hacia la isozima XII y la presente en la micobacteria (mtAC 3). Siendo este compuesto el que también presenta mejores resultados contra la mayoría de las cepas de *M. Tuberculosis*, demostrando que interviene el metabolismo de la micobacteria, inhibiendo su crecimiento. Por lo tanto se pueden pensar como compuestos líderes para el desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos. Asimismo los buenos resultados que presentan algunos de los compuestos frente a las isozimas presentes en procesos tumorales, abre la puerta a su estudio como potenciales antitumorales.



7



13

Finalmente el presente trabajo se ha visto parcialmente plasmado en el siguiente congreso científico:

- ✓ “Síntesis de dehidroparadoles como potenciales antitumorales y antimicobacterianos” L. E. Riafrecha, M. T. Custodio y P. A. Colinas. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO), Mendoza, Argentina. Noviembre de 2019.