



**UNR** Universidad  
Nacional de Rosario

FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y  
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**Tesis de Doctorado**

“Impacto de reacciones de halogenación sobre la composición y  
las actividades biológicas de mezclas complejas naturales”

Presentada por:

**Paula García**

Rosario, Argentina

**2016**



**“Impacto de reacciones de halogenación sobre la composición y las actividades biológicas de mezclas complejas naturales.”**

**Paula García**

**Farmacéutica, Universidad Nacional de Rosario**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Farmacognosia del Departamento de Química Orgánica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Agosto de 2011 y Febrero de 2016, bajo la dirección del Dr. Ricardo Luis Eugenio Furlán.



*“Un pájaro posado en un árbol nunca tiene miedo de que la rama se rompa, porque su confianza no está en la rama sino en sus propias alas.”*

*Anónimo*



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero agradecer mi director el Dr. Ricardo L. E. Furlán por haber dedicado su valioso tiempo en la dirección de esta tesis. Por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica para la concreción de este trabajo. Por haberme escuchado con paciencia y aconsejado con sabiduría frente a las adversidades y oportunidades que se fueron presentando durante estos años.*

*A mis padres, por darme la vida, creer en mí y festejar mis logros como si fueran propios. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.*

*A mis hermanos por toda una vida compartida, por enseñarme que para lograr lo posible es preciso intentar una y otra vez lo imposible. Por ser mi fuente infinita de motivación para superarme día a día.*

*A Agustín, mi compañero en la vida por estar a mi lado para escucharme y contenerme brindándome su tiempo y su amor. Por apoyarme incondicionalmente siempre y en particular durante esta etapa.*

*A mis amigas del colegio y de la vida, Paola, Nadia, Mariela, Ayelen, Aneley, Mariana Antonella, Sofía, Luciana, Paula y Lujan; por compartir tantos años y entender mis muchas ausencias durante esta etapa.*

*A la Dra. I. Ayelén Ramallo, por su valioso aporte en la corrección del manuscrito de esta tesis, por su ayuda y principalmente por su amistad.*

*A mis compañeros de trabajo Pablito, Mai, Carlos, Gastón y Andrea por compartir sus conocimientos conmigo. Les agradezco a ellos y a todos los amigos de Farmacognosia Marcos, Maximiliano, Laura, Estefanía, Agustina, Marcela, Melina, Natali, Melisa, Vicky y Silvia por su generosidad, su solidaridad, calidez y los buenos momentos compartidos.*

*A la Dra. Susana A. S. Zacchino por permitirme utilizar parte del espacio necesario para poder desarrollar mi trabajo de tesis.*

*A Oscar Micheloni y Luis Oakley del departamento de Química, Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires por la recolección e identificación del material vegetal.*

*Al Dr. Mario O. Salazar por las herramientas cromatográficas y espectroscópicas de CLAE-EMAR brindadas y los aportes profesionales durante este trabajo de tesis.*

*A Sergio Tindiglia y Pablo Duché por las herramientas espectroscópicas de RMN brindadas.*

*A la Bioq. Mónica Hourcade, por su trabajo en Servicio de Cromatografía Gaseosa.*

*A la Dra. Eleonora García Véscovi y a su grupo de trabajo del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario por la realización de los ensayos biológicos en Salmonella.*

*Al Dr. Claudio Fernandez y al personal del Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario por permitirme el acceso a equipos e instalaciones.*

*A las entidades que permitieron con su apoyo edilicio y/o financiero que este trabajo fuera llevado a cabo: UNR, ANPCyT y CONICET.*

*Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos los que hice mención ya que con su aporte hicieron posible esta presentación.*

Este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

## **PUBLICACIONES**

Ramallo, I. A., García, P. y Furlán, R. L. E. 2015. A reversed-phase compatible thin-layer chromatography autography for the detection of acetylcholinesterase inhibitors. *J. Sep. Sci.*, 38 (21), 3788-3794.

García, P., Furlán, R. L. E. 2015. Multiresponse Optimisation Applied to the Development of a TLC Autography for the Detection of Tyrosinase Inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 26 (4), 287-292.

## **PRESENTACIÓN A REUNIONES CIENTÍFICAS**

**García, P.;** Salazar, M.O.; Ramallo; I.A.; Furlán, R.L.E. “Aceites esenciales fluorados como fuente de nuevos compuestos semisintéticos bioactivos” en XX Simposio Nacional de Química Orgánica. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 11 al 14 de noviembre de 2015.

**García, P.;** Ramallo; I.A.; Salazar, M.O.; Furlán, R.L.E. “Identificación de compuesto inhibidor de xantina oxidasa mediante algoritmo aplicado a bioautografía enzimática acoplada a EMAR” en II Congreso Argentino de Espectrometría de Masa. Los Cocos, Córdoba Argentina. Del 9 al 11 de Noviembre de 2014.

**García, P.;** Zigaldo, J.A.; Furlán, R.L.E. Presentación “Detección de inhibidores de tirosinasa en mezclas complejas naturales y semisintéticas” en XIX Simposio Nacional de Química Orgánica. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 16 al 19 de noviembre de 2013. *Premio al mejor trabajo en el Área Productos Naturales.*

**García, P.;** Salazar, M.O.; Méndez, L.; Micheloni, O.; Furlán, R.L.E. Presentación “Estudio del efecto de reacciones de bromación sobre la composición química de extractos vegetales utilizando algoritmos y herramientas estadísticas para el análisis de cromatogramas obtenidos por LC-MS” en I Congreso Argentino de Espectrometría de Masa. Los Cocos, Córdoba Argentina. Del 11 al 13 de Noviembre de 2012.

**García, P.;** Furlán, R.L.E. Presentación “Optimización de autografía para detección de inhibidores de la enzima tirosinasa en extractos vegetales modificados por bromación” en XX Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. Del 3 al 5 de octubre del 2012.

**García, P.;** Salazar, M.O.; Méndez, L.; Micheloni, O.; Furlán R.L.E. Presentación “Análisis en la composición química y en la propiedades biomoleculares en extractos modificados con bromo” en XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 13 al 16 de noviembre de 2011.



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
PUBLICACIONES.....	vii
PRESENTACIÓN A REUNIONES CIENTÍFICAS .....	vii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	xix
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Diversificación química de mezclas complejas naturales .....	11
1.2 Productos naturales halogenados.....	13
1.3 Reacciones apropiadas para la diversificación química de mezclas naturales .....	14
1.3.1 Reacción de bromación.....	14
1.3.2 Reacción de fluoración .....	14
1.4 Evaluación de cambios en la composición química de mezclas complejas .....	15
1.5 Evaluación de propiedades biológicas.....	18
1.5.1 Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH.....	20
1.5.2 Detección de compuestos antioxidantes captadores de anión superóxido.....	21
1.5.3 Detección de actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -Glucosidasa.....	22
1.5.4 Detección de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa .....	22
1.5.5 Detección de actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa.....	23
1.5.6 Detección de actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa .....	25

1.5.7	Detección de inhibidores de la actividad reguladora de la virulencia de <i>Salmonella</i> (represión del sistema PhoP/PhoQ).....	26
2.	OBJETIVOS .....	29
2.1	Objetivos generales .....	31
2.2	Objetivos específicos .....	31
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1	Desarrollo de nuevas herramientas autográficas para detección de inhibidores enzimáticos.....	35
3.1.1	Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de tirosinasa.....	35
3.1.1.1	Selección de un sustrato apropiado .....	36
3.1.1.2	Selección de condiciones para la reacción enzimática sobre la placa cromatográfica.....	37
3.1.1.3	Diseño experimental de fase <i>screening</i> y de fase optimización.....	40
3.1.1.4	Definición de respuestas a evaluar .....	40
3.1.1.5	Fase <i>screening</i> de factores significativos .....	42
3.1.1.6	Fase de optimización.....	43
3.1.1.7	Verificación experimental.....	48
3.1.1.8	Aplicabilidad del ensayo para detección de inhibidores de tirosinasa en mezclas complejas.....	49
3.1.2	Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa.....	51

3.1.2.1	Sustrato fluorogénico.....	52
3.1.2.2	Selección de condiciones para la reacción enzimática sobre la placa cromatográfica .....	53
3.1.2.3	Definición de las respuestas experimentales .....	54
3.1.2.4	Fase de <i>screening</i> de factores significativos.....	55
3.1.2.5	Fase de optimización .....	56
3.1.2.6	Verificación experimental .....	60
3.1.2.7	Aplicabilidad para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa en mezclas complejas en CCD-FR.....	60
3.1.2.8	Aplicabilidad para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa en mezclas complejas en CCD en fase normal.....	62
3.2	Reacción de bromación.....	64
3.2.1	Modificación de extractos con bromo en solución y resina perbromada .....	65
3.2.1.1	Generación de extractos testigos .....	65
3.2.1.2	Rendimiento de extractos modificados y testigos .....	65
3.2.2	Análisis de cambios en la composición química de extractos modificados con bromo.....	66
3.2.2.1	Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados con bromo mediante CLAE-EM .....	67
3.2.2.2	Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados con bromo mediante RMN de <sup>1</sup> H .....	73

3.2.3	Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de extractos modificados con bromo en solución y con resina perbromada.....	77
3.2.3.1	Actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -Glucosidasa .....	77
3.2.4	Fraccionamiento bioguiado del extracto modificado de <i>Medicago lupulina</i> L. ....	78
3.2.5	Modificación de aceites esenciales con bromo .....	82
3.2.6	Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con bromo.....	83
3.2.6.1	Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con bromo mediante CG-EM. ....	84
3.2.6.2	Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con bromo mediante RMN de $^1\text{H}$ .....	87
3.2.7	Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de aceites esenciales modificados con bromo.....	90
3.2.7.1	Detección de compuestos antioxidantes.....	90
3.2.7.2	Detección de inhibidores enzimáticos.....	94
3.2.8	Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.....	104
3.2.9	Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de <i>Artemisia dracunculus</i> L.....	113
3.3	Reacción de fluoración.....	122
3.3.1	Modificación de aceites esenciales con flúor.....	122

3.3.2	Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con flúor.....	123
3.3.2.1	Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con fluor mediante CG-EM. ....	123
3.3.2.2	Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con flúor mediante RMN de <sup>1</sup> H. ....	127
3.3.3	Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de aceites esenciales modificados con flúor. ....	129
3.3.4	Aislamiento bioguiado de compuestos activos presentes en los aceites esenciales fluorados de <i>Artemisia dracunculus</i> L. y <i>Ocimum basilicum</i> L. ....	130
4.	CONCLUSIONES.....	139
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	149
5.1	Reactivos y solventes.....	151
5.2	Herramientas cromatográficas y espectroscópicas.....	151
5.3	Reveladores químicos.....	152
5.4	Extractos utilizados.....	153
5.4.1	Extractos metanólicos.....	153
5.4.2	Preparación de subextracto diclorometánico.....	153
5.5	Desarrollo de nuevas herramientas autográficas para la detección de inhibidores enzimáticos.....	154
5.5.1	Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de tirosinasa.....	154

5.5.2	Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa.....	157
5.6	Generación de extractos modificados con bromo .....	160
5.6.1	Generación de extractos modificados con bromo en solución.....	160
5.6.2	Generación de extractos modificados con resina perbromada.....	161
5.7	Generación de extractos testigos .....	161
5.7.1	Generación de extractos testigos para extractos modificados con bromo en solución.....	161
5.7.2	Generación de extractos testigos para extractos modificados con resina perbromada.....	161
5.8	Análisis de cambios en la composición química de extractos modificados con bromo en solución y resina perbromada .....	162
5.8.1	Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados por RMN de <sup>1</sup> H.....	162
5.8.2	Comparación de las composiciones químicas de extractos nativos y modificados con bromo por CLAE-EMAR .....	163
5.9	Fraccionamiento bioguiado del extracto diclorometánico modificado de <i>Medicago lupulina</i> L... ..	169
5.10	Aceites esenciales utilizados .....	170
5.11	Generación de aceites esenciales modificados con bromo .....	171
5.12	Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con bromo en solución .....	172

5.12.1	Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados por RMN de $^1\text{H}$ .....	172
5.12.2	Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales nativos y modificados con bromo por CG-EM .....	173
5.13	Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de <i>Foeniculum vulgare</i> L.....	177
5.13.1	Análisis mediante BIOMSID.....	178
5.14	Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de <i>Artemisia dracunculus</i> L. ....	179
5.15	Generación de aceites esenciales modificados con flúor.....	181
5.16	Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con flúor.....	181
5.16.1	Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados por RMN de $^1\text{H}$ .....	181
5.16.2	Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados con flúor por CG-EM.....	182
5.17	Aislamiento bioguiado de compuestos activos presentes en los aceites esenciales fluorados de <i>Artemisia dranculus</i> L. y <i>Ocimum basilicum</i> L.....	185
5.18	Comparación de cambios en las propiedades biomoleculares de los extractos y aceites esenciales modificados .....	187
5.18.1	Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH.....	187
5.18.2	Detección de compuestos antioxidantes captadores de anión superóxido.....	188

5.18.3	Actividad inhibitoria tirosinasa .....	188
5.18.4	Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa .....	189
5.18.5	Actividad inhibitoria $\beta$ -glucosidasa .....	190
5.18.6	Actividad inhibitoria de xantina oxidasa.....	190
5.18.7	Ensayo de inhibicion del sistema PhoP/PhoQ en <i>Salmonella</i> .....	191
6.	ANEXOS.....	195
I.	Anexo: Experimentos de RMN para el Compuesto <b>1</b> .....	197
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135.....	197
B.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY.....	198
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC.....	199
D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC.....	200
II.	Anexo: Experimentos de RMN para el Compuesto <b>2</b> .....	201
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135.....	201
B.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	202
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC.....	203
D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	204
III.	Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto <b>3</b> .....	204
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135.....	205
B.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	206
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC.....	207

D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	208
IV.	Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto <b>4</b> .....	208
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135 .....	209
B.	Espectro de $^{19}\text{F}$ .....	209
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	210
D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC .....	211
E.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	212
V.	Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto <b>5</b> .....	212
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135 .....	213
B.	Espectro de $^{19}\text{F}$ .....	213
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	214
D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC .....	215
E.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	216
VI.	Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto <b>6</b> .....	216
A.	Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135 .....	217
B.	Espectro de $^{19}\text{F}$ .....	217
C.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY .....	218
D.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC .....	219
E.	Espectro de $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	220
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	221



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt: Acetato de etilo

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ACP: Análisis de Componentes Principales.

AI: Acetato de Indoxilo

AEs: Aceites Esenciales

AEBs: Aceites Esenciales Bromados

AEFs: Aceites Esenciales Fluorados

BIOMSID: Bioautografía acoplada a espectrometría de masa para la identificación de compuestos (en inglés *BIOautography coupled to Mass Spectrometry for the IDentification of compounds*)

CC: Cromatografía en Columna.

CCD: Cromatografía en Capa Delgada

CDCl<sub>3</sub>: Cloroformo deuterado

CG: Cromatografía gaseosa

CHCl<sub>3</sub>: Cloroformo

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media

CLAE-EMAR: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masa de Alta Resolución

COSY: Correlación espectroscópica (en inglés *Correlation Spectroscopy*)

CP1: Componente Principal 1

CP2: Componente Principal 2

CP3: Componente Principal 3

CPs: Componentes Principales

DCM: Diclorometano

DEPT: Mejora sin distorsión por transferencia de polarización (en inglés *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOI: Densidad Óptica Integrada

DPPH: 2,2-di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo

EM: Espetrometría de Masa

EMAR: Espetrometría de Masa de Alta Resolución.

ET: Extracto Testigo

EMB: Extracto Modificado con Bromo en solución

EMR: Extracto Modificado con Resina perbromada.

FR: Fase Reversa

HMBC: Correlación heteronuclear a varios enlaces (en inglés *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

HSQC-DEPT: Correlación heteronuclear cuántica simple con mejora sin distorsión por transferencia de polarización (en inglés *Heteronuclear Single Quantum Correlation-Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

[M<sup>+</sup>]: Ion molecular

MeOH: Metanol

meq: Miliequivalente/s

mmol: Milimol/es

MSR: Métodos de Superficie de Respuesta

*m/z*: Relación masa-carga

NBT: Azul de nitrotetrazolio

NG: Nivel de Gris

NH: Número de Halos

PNs: Productos Naturales

ppm: Partes por millón

% P/P: Porcentaje Peso en Peso

% P/V: Porcentaje Peso en Volumen

ProMetab: Código para el procesamiento de perfiles de metabolitos (en inglés *Code for Processing Metabolite profiles*)

*R<sub>f</sub>*: Relación de frente

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

$R^2$ : Cuadrado del coeficiente de regresión lineal

TEA: Trietanolamina

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

TOMCAT: Caja de herramientas para la técnica de calibración multivariante (en inglés *Toolbox for Multivariate Calibration Technique*)

$T_{inc}$ : Temperatura de incubación

$t_{inc}$ : tiempo de incubación

$t_R$ : Tiempo de retención

U: Unidad de actividad enzimática

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: luz Ultravioleta.

XO: xantina oxidasa

## **RESUMEN**

Un paso limitante en la búsqueda de nuevas drogas es el acceso a bibliotecas de compuestos con propiedades biológicas interesantes. Los productos naturales (PNs) han sido muy valiosos como plataforma validada biológicamente por contener esqueletos moleculares que presentan dichas cualidades.

Una metodología que utiliza a los PNs como punto de partida para la generación de compuestos con potencial actividad biológica es la Diversificación Química de Extractos. La misma apunta a producir cambios en las estructuras químicas de los componentes de extractos naturales a través de reacciones químicas seleccionadas. Estos cambios consisten en la introducción de grupos funcionales o de elementos atípicamente encontrados en derivados de origen natural, a través de reacciones que transforman grupos funcionales de alta presencia en PNs tales como los dobles enlaces y los anillos aromáticos.

La incorporación de átomos de halógeno en PNs de origen vegetal resulta interesante puesto que:

- (a) es una estrategia comúnmente utilizada en química medicinal para alterar bioactividades de moléculas orgánicas.
- (b) la proporción de halógenos presentes en drogas es significativamente mayor que en PNs.
- (c) la mayor parte de los PNs halogenados son producidos por organismos marinos, siendo este tipo de metabolitos muy raros en otro tipo de vegetales.
- (d) existen reactivos que podrían introducir este tipo de elementos a través de grupos funcionales muy comunes en metabolitos secundarios tales como los dobles enlaces o los anillos aromáticos.

Entre los diferentes halógenos a introducir, se seleccionó inicialmente al bromo, fundamentalmente porque presentó facilidades experimentales para su introducción en mezclas complejas.

Cuando se utiliza la diversificación química de extractos, tanto el seguimiento de las reacciones como el monitoreo de su efecto sobre diferentes propiedades de las mezclas se ven dificultados tanto por la complejidad de las mezclas de partida y de las mezclas producto, como por el desconocimiento de su composición química exacta. Para llevar adelante este

seguimiento se efectuó la comparación de sus (a) perfiles químicos y (b) perfiles de bioactividades.

(a) Los perfiles químicos tienen como objeto estimar el éxito de la reacción y su impacto en la composición. Con “éxito de la reacción” nos referimos a tratar de observar cambios en propiedades relacionadas a los grupos funcionales de alta presencia a modificar o a elementos que se desea introducir en la mezcla. Con “impacto de la reacción” nos referimos al grado en que la composición química es alterada por la reacción. Para estos análisis se utilizaron métodos cromatográficos, espectroscópicos o combinaciones de éstos, acoplados a análisis estadístico multivariado.

(b) La comparación de perfiles de diferentes actividades biológicas entre los extractos de partida y los extractos halogenados se realizó a través ensayos autográficos sobre placas cromatográficas. Dado que estos métodos autográficos permiten combinar la capacidad separativa de la cromatografía en capa delgada (CCD) con la determinación *in situ* de la actividad biológica de los componentes de una mezcla de compuestos químicos, permiten preasignar de manera cualitativa actividades biológicas observadas en una mezcla a uno o más de los componentes de la misma. Con este fin, se utilizaron ensayos autográficos previamente descritos para detectar compuestos antioxidantes e inhibidores de acetilcolinesterasa, xantina oxidasa y  $\beta$ -glucosidasa. Además se desarrollaron durante esta tesis dos ensayos autográficos enzimáticos, un ensayo para detectar inhibidores de tirosinasa y uno para detectar inhibidores de acetilcolinesterasa compatible con CCD sobre fase reversa (FR). Siendo la principal dificultad en el desarrollo de este tipo de ensayos enzimáticos encontrar las condiciones adecuadas para lograr buena reproducibilidad, homogeneidad de color, buena definición de halos y ausencia de resultados falsos, en esta tesis se estudiaron las ventajas del uso de geles como soportes enzimáticos. Además, se utilizaron diseño experimental y métodos de optimización multicriterio (Métodos de Superficie de Respuesta y uso de funciones de deseabilidad) para buscar condiciones de ensayo óptimas. Esto permitió encontrar condiciones en las que los dos nuevos ensayos presentan buena sensibilidad para la detección para inhibidores conocidos de las enzimas presentes en mezclas complejas.

En un principio se bromaron 7 extractos de malezas siguiendo dos protocolos, uno utilizando bromo en solución y otro utilizando bromo inmovilizado en un soporte sólido. La comparación de los espectros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN de  $^1\text{H}$ ) combinada con análisis de componentes principales (ACP) permitió observar la separación de

las muestras en grupos correspondientes a extractos naturales y a extractos modificados. El análisis del gráfico de *loadings* del CP2, principal responsable de la separación de los grupos, muestra que los *bins* con mayor efecto en este CP corresponden a una zona de desplazamiento químico de señales de dobles enlaces, uno de los grupos blanco de la reacción. Estos resultados sugieren que a pesar de que las mezclas de partida y producto son complejas y de composición mayoritariamente desconocida, existen diferencias entre estas composiciones y que estas diferencias se centran en uno de los grupos blanco de la modificación química.

Este análisis se complementó utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa de alta resolución (CLAE-EMAR), al menos un 85% de los picos presentes en los extractos testigo (ETs) desaparecen debido a la reacción (en promedio desaparece el 92 %). Paralelamente, se observa que en promedio un 90% de los picos presentes en los extractos bromados son producto de la reacción. En general los resultados fueron muy similares para los extractos bromados producidos con ambos protocolos de reacción. Por su parte la reacción de bromación con resina provoca la desaparición de al menos un 68 % de los picos presentes en los ETs (93 % en promedio), mientras que los picos cromatográficos que aparecen en los extractos bromados como resultado de la reacción representan el 88 %. La combinación de estos datos con un ACP mostró nuevamente la discriminación de los extractos en dos grupos, uno que incluye a los testigos y otro que incluye a los modificados.

De este grupo de extractos modificados, la actividad biológica más interesante se obtuvo para el extracto de *Medicago lupulina* L. modificado con bromo en solución, el cual presentó actividad inhibitoria de la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Se fraccionó el mismo por columna cromatográfica (CC) de sephadex LH-20, en este fraccionamiento se encontraron 6 fracciones que resultaron activas, las cuales se analizaron por EM mediante infusión directa en modo de ionización negativo. Entre los iones moleculares presentes en cada fracción se encuentran cuatro iones moleculares que tienen el patrón isotópico característico de los compuestos que contienen bromo en su estructura. Si bien a partir de este análisis no puede adjudicarse la actividad a ninguno de los iones moleculares nos permite corroborar que hay compuestos bromados en las fracciones activas.

Con el fin introducir nuevas mezclas complejas como material de partida, posteriormente se realizó la bromación de 32 aceites esenciales (AEs) utilizando bromo en solución. Los perfiles químicos de los aceites esenciales bromados (AEBs) generados fueron

comparados con aquellos de los AEs que le dieron origen utilizando CCD, RMN de  $^1\text{H}$  y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM), observando en todos los casos diferencias interesantes.

A partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se realizó un ACP, observándose que las mezclas se separan en el CP2 en dos grupos. El gráfico de *loadings* del CP2 reveló que los *bins* con mayor influencia sobre este componente principal corresponden a zonas de desplazamiento químico de señales de dobles enlaces, dobles enlaces conjugados con anillos aromáticos y protones de metilos de alcanos en posición  $\alpha$  a dobles enlaces. Estos resultados indican que las diferencias observadas se centran en grupos blanco de la modificación química o en grupos adyacentes a estos.

Las 64 mezclas fueron además analizadas por CG-EM detectando importantes diferencias en los perfiles químicos de los AEs respecto a los AEBs. En promedio el 90 % de los picos detectados en los cromatogramas de los AEs desaparecen como resultado de la reacción y el 96 % de los picos presentes en los AEBs están ausentes en los AEs, es decir representan compuestos nuevos generados por la reacción. Además se observó que el número de compuestos promedio en los AEBs es casi el doble que en sus mezclas precursoras y que el 64 % de los compuestos generados incorporaron al menos un átomo de bromo. En conjunto estos resultados demuestran el alto impacto que tiene la reacción de bromación en la alteración de la composición química de los AEs.

La evaluación de las propiedades biológicas se realizó a través de cuatro ensayos autográficos enzimáticos y dos ensayos químicos, observando interesantes cambios resultantes de la reacción. Considerando la totalidad de las muestras, el número de halos de inhibición generados por la reacción (ausentes en los AEs de partida) fue significativo. Dependiendo de la actividad biológica evaluada, entre el 54 % y el 89 % de los halos observados en los AEs bromados fueron resultantes de la reacción. El mayor impacto en las propiedades biológicas de estas mezclas fue observado en la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, donde el porcentaje de activos presentes en los aceites bromados y ausentes en los aceites esenciales de partida es mayor al 80 %. Dos de los aceites esenciales bromados bioactivos, fueron sometidos a fraccionamiento bioguiado con el objeto de aislar los compuestos responsables de las actividades observadas en las mezclas.

Uno de los halos más interesantes en los ensayos de actividad inhibitoria de las enzimas tirosinasa y xantina oxidasa fue presentado por el aceite esencial bromado de

*Foeniculum vulgare* Mill. Su fraccionamiento mediante cromatografía, guiado por autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa llevó al aislamiento e identificación del compuesto 2-bromo-1-(4-metoxifenil) propan-1-ona (**1**). A los fines de identificar al compuesto inhibidor de xantina oxidasa presente en este mismo aceite esencial modificado de *F. vulgare* se aplicó la metodología BIOMSID (del inglés, *BIOautography coupled to Mass Spectrometry for the IDentification of compounds*), que permite acoplar EMAR con halos de inhibición bioautográficos. De esta manera se verificó que la fórmula molecular correspondiente al compuesto activo era  $C_{10}H_{11}BrO_2$ , observando el correspondiente patrón isotópico característico de compuestos bromados en el espectro de masa. De esta forma, se corroboró rápidamente que el compuesto responsable de la actividad inhibitoria para ambas enzimas era el mismo. A fin de cuantificar la actividad inhibitoria de este compuesto frente a las enzimas tirosinasa y xantina oxidasa se realizaron ensayos en microplaca. En el ensayo de tirosinasa el compuesto presentó una concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de 21,40  $\mu M$ , siendo 1,96 veces más activo que el inhibidor de referencia ácido kójico ( $CI_{50}$  42,16  $\mu M$ ). Con respecto a la actividad inhibitoria xantina oxidasa el compuesto presentó una  $CI_{50}$  de 5,90  $\mu M$ , siendo compuesto 2,26 veces menos activo que el alopurinol ( $CI_{50}$  2,60  $\mu M$ ).

Paralelamente, el AEB de *Artemisia dracunculus* L. presentó dos halos interesantes en el ensayo de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, por lo cual se realizó su fraccionamiento bioguiado mediante cromatografía en columna. Se aislaron e identificaron dos compuestos activos: 1-(2,3-dibromopropil)-4-metoxibenceno (**2**) y 1-(1,3-dibromopropan-2-il)-4-metoxibenceno (**3**). La actividad inhibitoria de estos compuestos frente a la enzima acetilcolinesterasa se cuantificó a través de ensayos en microplaca observando que ambos son débiles inhibidores. El compuesto **2** posee una  $CI_{50}$  de 88,47  $\mu M$  y el compuesto **3** posee una  $CI_{50}$  de 70,93  $\mu M$ , siendo ambos más de 100 veces menos activos que el inhibidor de referencia fisostigmina ( $CI_{50}$  0,63  $\mu M$ ).

En vistas de la gran importancia del flúor en química medicinal y de que los metabolitos conteniendo flúor son minoritarios dentro de los PNs halogenados, se realizó la fluoración de 12 aceites esenciales (AEs). Los perfiles químicos de los aceites esenciales fluorados (AEFs) generados fueron comparados con aquellos de los AEs que le dieron origen utilizando CCD, RMN de  $^1H$ , RMN de  $^{19}F$  y CG-EM, observando en todos los casos diferencias interesantes.

Los espectros de  $^{19}\text{F}$  de los AEFs mostraron un número variable de señales, que no fueron observadas en los espectros de los AEs de partida, indicando la incorporación de este elemento en los componentes de las mezclas. A partir de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se realizó un ACP, observándose que las mezclas se separan en el CP3 en dos grupos: los AEF presentan valores mayores a 8 para el CP3, en tanto que todas las mezclas de partida mostraron valores por debajo de 7 para dicha variable. Las 24 mezclas fueron además analizadas por CG-EM detectando importantes diferencias en los perfiles químicos de los AEs respecto a los AEFs. En este análisis se observó que en promedio el 90 % de los picos detectados en los cromatogramas de los AEs desaparecen como resultado de la reacción y que el 96 % de los picos presentes en los AEFs están ausentes en los AEs, es decir representan compuestos nuevos generados por la reacción. Además se observó que el número de compuestos promedio en los AEFs es casi cuatro veces mayor que en sus mezclas precursoras. Demostrando de esta forma el alto impacto que tiene la reacción de fluoración en la alteración de la composición química de los AEs. Los datos obtenidos por CG-EM fueron además transformados a un formato bidimensional, y procesados estadísticamente (ACP). De manera similar a lo observado para los datos de RMN, la población se separa en dos grupos, uno correspondiente a los AEFs y otro a los AEs de partida. Estos resultados en conjunto (CCD, RMN $^1\text{H}$  y  $^{19}\text{F}$ , RMN $^1\text{H}$ -ACP, CGEM y CGEM-ACP) demuestran la factibilidad de generar compuestos organofluorados a partir de esqueletos de origen natural por medio de reacciones de fluoración.

Al analizar los cambios en las propiedades biomoleculares de los AEFs, los resultados más interesantes fueron obtenidos para los AEFs de *A. dracunculus* y *O. basilicum* en cuanto a su capacidad inhibitoria de la enzima tirosinasa. Ambos AEFs presentaron 3 halos nuevos de inhibición luego de la reacción de fluoración que eran aparentemente los mismos. A fin de determinar los compuestos responsables de la actividades detectadas, se realizó la fluoración de metilchavicol, uno de los constituyentes principales de los AEs de partida. Esta reacción condujo al aislamiento y a la identificación de los tres compuestos inhibidores de tirosinasa: 4-allil-2-fluoro-1-metoxibenzeno (**4**), 1-allil-2-fluoro-4-metoxibenzeno (**5**) y 4-fluoro-4-propenilciclohexa-2,5-dienona (**6**). A fin de cuantificar la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa se realizaron ensayos en microplaca: el metilchavicol resultó ser inactivo en el rango de concentraciones ensayado, en tanto que los compuestos **4** ( $\text{CI}_{50}=97,48 \mu\text{M}$ ) y **5** ( $\text{CI}_{50}=174,20 \mu\text{M}$ ) resultaron débiles inhibidores. El resultado más destacado fue el obtenido para el compuesto **6** para el que se determinó un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $59,14 \mu\text{M}$ , actividad similar a la

reportada para uno de los inhibidores de referencia para este blanco terapéutico como es el ácido kójico el cual presentó, en las mismas condiciones de experimentación, un valor de  $CI_{50}$  de 42,16  $\mu$ M.

Como resumen, durante este trabajo de tesis doctoral se modificaron 7 extractos de malezas utilizando dos protocolos de bromación diferentes (bromación en solución y con resina perbromada), 32 aceites esenciales mediante bromación en solución y 12 aceites esenciales mediante fluoración directa. Además se desarrollaron dos nuevos ensayos autográficos para detección de inhibidores de tirosinasa y de acetilcolinesterasa, este último compatible con CCD-FR. Se realizó el aislamiento bioguiado y la caracterización química y biológica de 6 compuestos activos generados a través de reacciones de halogenación.



# **1.INTRODUCCIÓN**

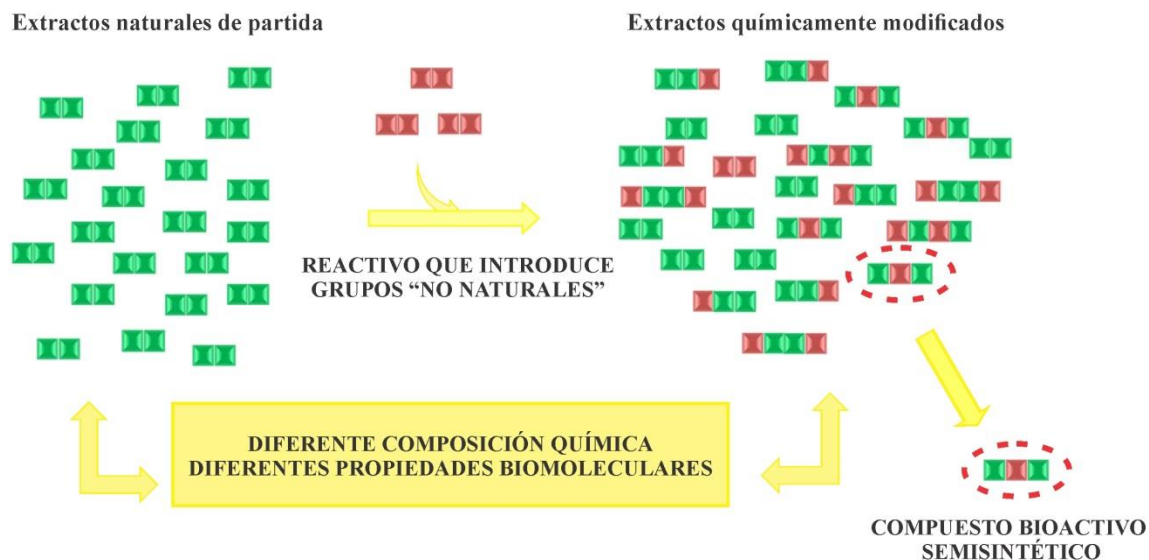


### 1.1 Diversificación química de mezclas complejas naturales

Un paso limitante en la búsqueda de nuevas drogas es el acceso a bibliotecas de compuestos con propiedades biológicas interesantes. Los productos naturales (PNs) han sido muy valiosos como plataforma validada biológicamente,<sup>1</sup> debido a que son el resultado de un largo proceso de evolución que ha dado lugar a una gran variedad de esqueletos con alta afinidad por biomoléculas.<sup>2</sup>

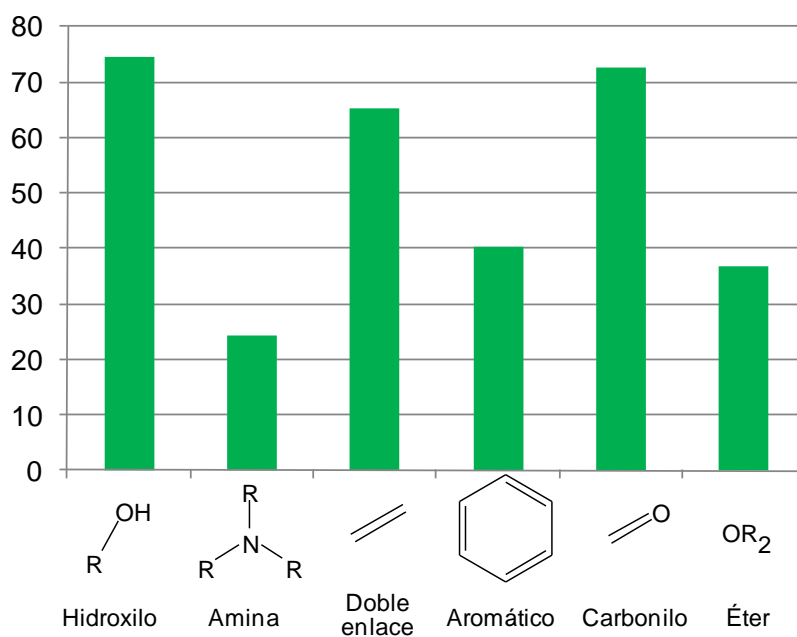
En una serie de artículos de revisión, Newman, Craig y colaboradores,<sup>3,4,5,6</sup> han analizado las fuentes de drogas de los últimos 30 años. Este análisis demostró la valiosa y continua contribución de los PNs como fuente de compuestos líderes que han servido de inspiración para la síntesis de nuevas drogas.<sup>7,8</sup> Un análisis detallado de los nuevos medicamentos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) entre 1981 y 2010 revela que el 34 % de los medicamentos que estaban basados en moléculas pequeñas eran PNs o derivados directos de los mismos;<sup>5</sup> incluyendo las estatinas, diferentes medicamentos contra el cáncer y algunos inmunosupresores.<sup>9,10</sup>

La modificación química de componentes de un extracto natural es una forma evidente de alterar sus propiedades. En la literatura se encuentran ejemplos donde la formación de artefactos producidos por reacción con solventes han conducido a cambios en la bioactividad de distintos PNs en forma positiva o negativa.<sup>11</sup> Se han propuesto varios enfoques para aumentar la diversidad de mezclas de PNs tales como la diversificación de las mezclas de PNs mediante biosíntesis combinatoria y técnicas relacionadas.<sup>12, 13</sup> La preparación de extractos modificados a través de diversificación química dirigida representa una forma alternativa de usar esqueletos naturales conocidos y desconocidos como material de partida para la generación de bibliotecas semisintéticas de compuestos (**Figura 1**).<sup>14</sup> La clave para lograr la alteración de una proporción significativa de los componentes de la mezcla yace en la selección de potenciales grupos reactivos que puedan ser encontrados en la mayoría de las pequeñas moléculas presentes en PNs.<sup>15</sup>



**Figura 1.** Diversificación química de mezclas complejas naturales como fuente de nuevos compuestos bioactivos.

Para la elección de estos fragmentos reactivos, se han buscado esos grupos funcionales en el Diccionario de Productos Naturales (DNP, del inglés *Dictionary of Natural Products* versión 2001).<sup>16</sup> Según esta base de datos, alrededor del 75 % de las moléculas dentro de la misma poseen al menos un grupo hidroxilo y una similar proporción de moléculas poseen grupos carbonilo o un doble enlace (**Figura 2**). En menor proporción algunos PNs también contienen anillos aromáticos y fragmentos nitrogenados.<sup>17</sup>



**Figura 2.** Porcentaje de productos naturales que contienen diferentes grupos funcionales mayoritarios.

Teniendo seleccionados fragmentos reactivos presentes en una alta proporción de PNs, la implementación de la estrategia requiere de la combinación de: reacciones químicas apropiadas para generar extractos modificados, métodos adecuados para el análisis de la composición de mezclas y ensayos adecuados para el análisis de la actividad biológica.

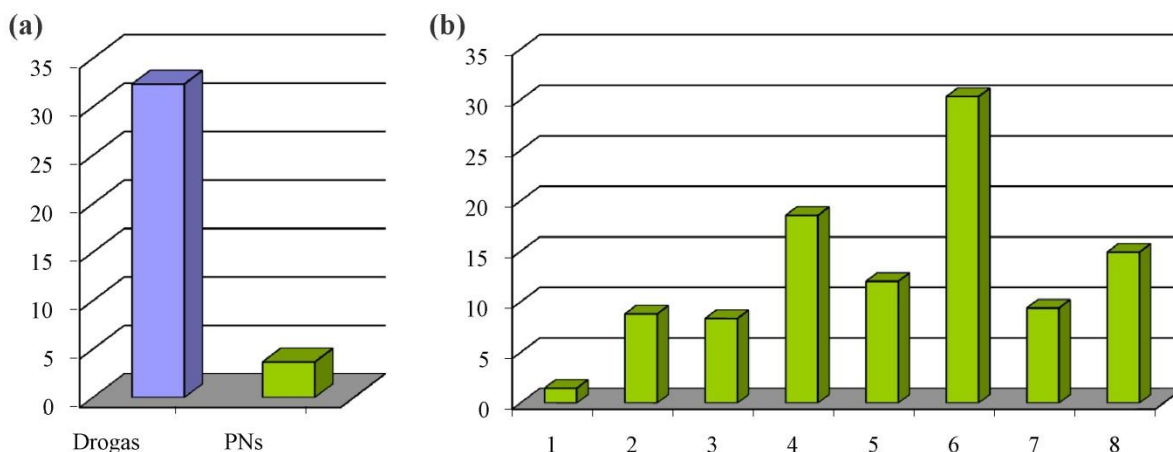
Recientemente, procedimientos de hidracinólisis,<sup>14,18</sup> sulfonilación,<sup>19</sup> bromación,<sup>20</sup> etanolisis<sup>21</sup> y epoxidación<sup>22</sup> ha sido aplicados a extractos de plantas para obtener compuestos nuevos bioactivos. En el grupo se han utilizado reacciones que incorporan átomos de nitrógeno a través de grupos carbonilo, azufre por transformación de hidroxilos y aminas, y bromo por reacción con dobles enlaces y anillos aromáticos.<sup>15</sup> La incorporación de átomos de nitrógeno a través de reacción con hidracina ha llevado al aislamiento de pirazoles con actividad antifúngica<sup>14</sup> y con actividad inhibidora de la agregación del péptido A $\beta$ .<sup>18</sup> La incorporación de átomos de azufre mediante reacción con cloruros de arilsulfonilo ha llevado al aislamiento de un derivado de histamina inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa.<sup>23</sup> Por su parte la modificación química de un extracto por incorporación de bromo ha llevado al aislamiento de un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa.<sup>20</sup>

## 1.2 *Productos naturales halogenados*

Los compuestos halogenados tienen gran importancia en química medicinal puesto que el intercambio de átomos de H por Br, Cl o F puede alterar significativamente las propiedades biológicas de una molécula.<sup>24,25</sup> Por lo tanto, la incorporación de halógenos ha sido una estrategia común en el diseño de drogas que tiene por objetivo cambiar las bioactividades y especificidades de moléculas hacia determinados blancos terapéuticos.<sup>26</sup>

Diferentes estudios demuestran que la media de compuestos que presentan halógenos es mayor en drogas que en PNs.<sup>27,28,29</sup> Se ha estimado que el contenido de halógenos en drogas (columna azul, **Figura 3a**) es aproximadamente 9 veces mayor al que presentan los PN (columna verde, **Figura 3a**).<sup>27</sup> Los principales productores de PNs halogenados son los organismos marinos,<sup>30,31,32,33</sup> y por el contrario su presencia en plantas terrestres es rara (**Figura 3b**).<sup>34</sup>

Estos datos nos inspiraron para intentar la halogenación de mezclas de origen vegetal, provenientes de plantas superiores, con el fin de ampliar la diversidad química de sus componentes naturales y a partir de esto generar nuevos compuestos con actividad biológica.



**Figura 3.** (a) Porcentaje del contenido de halógenos en drogas y PNs; (b) Porcentaje del contenido de halógenos en compuestos obtenidos de: 1- Plantas, 2-Hongos, 3-Bacterias, 4- Organismos marinos, 5- Actinomicetes, 6- Algas, 7- Insectos y gusanos y 8-Moluscos.

### 1.3 Reacciones apropiadas para la diversificación química de mezclas naturales

#### 1.3.1 Reacción de bromación

Un buen número de metabolitos organobromados con actividad antibacteriana,<sup>35</sup> antitumoral<sup>36</sup>, antiviral<sup>37</sup> y antifúngica<sup>38</sup> han sido aislados de corales, moluscos, algas y esponjas marinas, entre otros. Al contrario, como se mencionó previamente, son pocos los compuestos conteniendo bromo que se han aislado de plantas terrestres.<sup>32,33</sup> Sin embargo, una proporción significativa de los metabolitos provenientes de estas plantas contienen dobles enlaces y anillos aromáticos (**Figura 2**) que podrían ser blanco de una reacción de bromación. Las reacciones de bromación de dobles enlaces y de anillos aromáticos proceden mediante mecanismos de adición y sustitución respectivamente. El primero resulta en la adición de una molécula de bromo a carbonos  $sp^2$  y el segundo en el intercambio de un átomo de hidrogeno por un átomo de bromo. Ambos cambios aumentan la hidrofobicidad y el tamaño de la molécula, afectando tanto la forma como las propiedades electrónicas de la misma.

#### 1.3.2 Reacción de fluoración

Sin lugar a dudas, uno de los elementos más relevantes de los presentes en compuestos bioactivos es el flúor. Debido a su pequeño tamaño, la incorporación de un átomo de flúor en una molécula causa una perturbación estérica mínima. Sin embargo, la introducción de flúor en una molécula puede afectar/modular propiedades fisicoquímicas tales como pKa, lipofilia,

capacidad de formar enlaces de hidrógeno y de involucrarse en interacciones electrostáticas, así como su estabilidad metabólica (metabolismo oxidativo, metabolismo hidrolítico y racemización *in vivo*).<sup>39</sup> El uso estratégico de la sustitución con flúor en el diseño de fármacos ha conducido a la producción de algunos de los medicamentos clave disponibles en el mercado.<sup>40</sup>

La proporción promedio de flúor en las drogas es significativamente mayor que en PNs.<sup>41</sup> Los compuestos organofluorados representan menos del 1 % de los compuestos organohalogenados de origen natural.<sup>42</sup>

Teniendo en cuenta que: (a) los PNs han tenido un impacto significativo en el desarrollo de medicamentos, (b) el 20-25 % de los medicamentos actualmente en desarrollo por parte de la industria farmacéutica contiene al menos un átomo de flúor<sup>39</sup> y (c) los compuestos organofluorados son muy raros entre los PNs,<sup>43</sup> resulta interesante evaluar el efecto de la reacción de fluoración en las propiedades biológicas de mezclas naturales.

#### **1.4 Evaluación de cambios en la composición química de mezclas complejas**

En vista de la diversidad química de las moléculas, provenientes del metabolismo secundario de plantas presentes en los extractos, no es factible realizar la determinación de la composición química absoluta de los extractos crudos ni de los extractos que resulten de su modificación química. En ese sentido, uno de los desafíos de este trabajo de tesis es la selección y utilización de metodologías que permitan analizar la mayor cantidad de compuestos posible, sin conocer sus estructuras químicas. Ninguna técnica es adecuada para el análisis de todo tipo de moléculas por lo cual se utilizaron técnicas que son relativamente complementarias.

Dentro de las técnicas analíticas útiles para establecer perfiles y analizar la composición de mezclas complejas de metabolitos como son los extractos vegetales y los aceites esenciales, pueden considerarse las cromatográficas, espectroscópicas y sus combinaciones.

Entre las técnicas cromatográficas, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CLAE-EM) es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de mezclas complejas de origen natural, que se ha impuesto como una combinación robusta que permite la identificación de cientos de metabolitos dentro de estas mezclas. Al acoplar técnicas como la cromatografía líquida a analizadores de masa de tiempo de vuelo, se permite una correcta

deconvolución de los picos de mezclas complejas, debido a la alta velocidad de escaneo que presentan estos instrumentos. Las mezclas complejas contienen decenas de compuestos que coeluyen que varían en abundancia en varios grados de magnitud. Por lo tanto una correcta deconvolución espectral y un amplio rango dinámico son requeridos para obtener espectros y formas de picos de buena calidad. Para solucionar problemas de resolución espectral y preprocesar los cromatogramas antes de su análisis se han desarrollado diferentes herramientas y algoritmos.<sup>44</sup> En el caso particular de los aceites esenciales, el acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masa (CG-EM) es la técnica más utilizada para el análisis de su composición química. Esto es debido al desarrollo de sistemas potentes en cuanto a sensibilidad, velocidad de adquisición y procesamiento de datos, siendo además de fácil manejo y relativamente bajo costo. La gran mayoría de las aplicaciones de CG-EM utilizan CG capilar unidimensional con detector de cuadrupolo simple e ionización por impacto electrónico (IE).

Dentro de las técnicas espectroscópicas, en las últimas décadas la resonancia magnética nuclear (RMN) se ha desarrollado como una herramienta para obtener huellas dactilares de mezclas complejas. Aunque su sensibilidad es pobre, la RMN de  $^1\text{H}$  provee un sistema de detección de sensibilidad uniforme para todas las moléculas que contienen protones, por el contrario, la EM (particularmente en infusión directa) es selectivamente sensible, con tendencia a efectos de la matriz, y puede ser insensible a algunas clases de analito.<sup>45</sup>

De las múltiples plataformas analíticas disponibles para llevar a cabo este tipo de análisis, la RMN y la EM han llegado a dominar el campo, debido a la gran cantidad de información estructural que se puede reunir con ambas técnicas. El gran volumen de datos obtenidos por RMN y EM suele hacer necesario el uso de herramientas de análisis multivariado que faciliten su exploración y/o interpretación.<sup>46</sup>

Estas herramientas de análisis multivariado apuntan a la reducción de la dimensionalidad de los datos minimizando la pérdida de información, a través de la construcción de nuevas variables (combinaciones matemáticas de las originales) de forma tal que, ordenándolas por su peso en el modelo permiten hallar las principales causas de variabilidad en el conjunto de datos (señales de RMN de  $^1\text{H}$ , o fragmentos de masa).

En términos generales, el flujograma analítico comienza con la conversión de datos, detección de señales, normalización y comparación de múltiples conjuntos de datos para

generar una matriz de datos que incluye las señales de picos de todas las muestras dadas (alineación). Esta matriz de datos por lo general se compone de  $m$  filas de variables (que suelen denominarse *buckets* para CLAE-EM o CG-EM; y *bins* para RMN de  $^1\text{H}$ ), y de  $n$  columnas de observaciones (por ejemplo, extractos modificados y testigos) (**Figura 4a**).

La representación gráfica de esta matriz ocupa un espacio  $m$ -dimensional (**Figura 4b**). Es aquí en donde comienzan a ser imprescindibles las mencionadas herramientas de reducción de dimensionalidad que clasifican variables en función de su influencia en el conjunto de datos.

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una de ellas.<sup>47</sup> El ACP es un método no supervisado (no hay una asignación previa de las observaciones a un grupo de muestras). La combinación lineal de las variables originales genera componentes principales (CPs) que tienen la característica de ser ortogonales, es decir cada CP recoge la variabilidad no comprendida por el componente inmediato anterior.

La interpretación de los CPs se favorece representando las proyecciones de las muestras sobre un espacio de 2 (o 3) dimensiones (gráficos de dispersión), definido por los CPs que acumulan la mayor variancia (explican la mayor cantidad de la variancia total de las variables originales) (**Figura 4c**). El CP1 describe la mayor variación en el conjunto de datos, CP2 describe la segunda mayor variancia y es ortogonal a CP1, y así sucesivamente. Esto es indicado por la fuerza y la orientación de las flechas (**Figura 4c**). Las representaciones generadas a partir de estos primeros CPs permiten tener una idea de las medidas numéricas de muchas variables en un espacio de pocas dimensiones (“reducción de la dimensionalidad”).

La variancia explicada se calcula como la suma de la variancia individual. En la mayoría de los casos, unos pocos CPs (en comparación con el gran número de variables originales) explican la mayor parte de la variancia (**Figura 4d**).

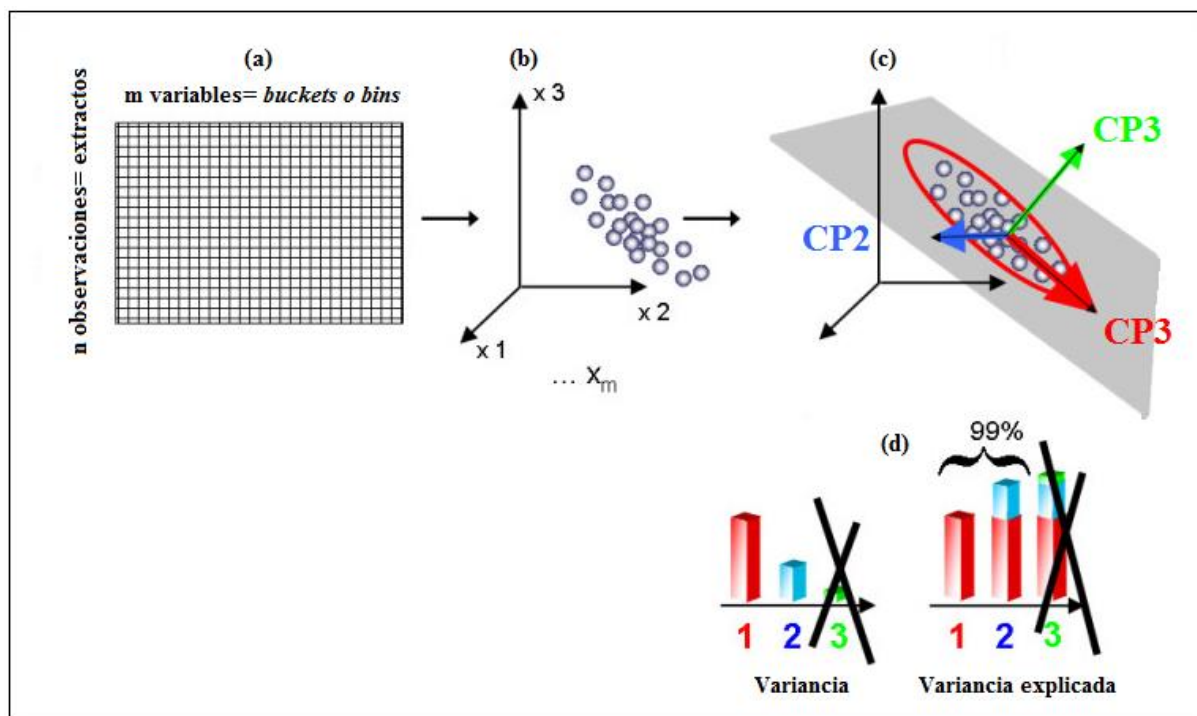


Figura 4. Transformación de una matriz de información tabular en CPs.

### 1.5 Evaluación de propiedades biológicas

La identificación y el aislamiento de compuestos químicos con actividad biológica a partir de mezclas complejas como los extractos naturales (o modificados) suelen ser desafíos experimentales de alto costo en términos de tiempo y de dinero. El proceso involucra etapas de fraccionamiento de mezclas y de análisis de bioactividad, las cuales se alternan el número de veces que sea necesario para lograr la purificación del o de los compuestos activos. Esto hace que resulte atractivo el desarrollo de métodos de análisis que se ubiquen en la interfase de estas etapas, conectando las características químicas de las mezclas con su bioactividad. Este es el caso de los métodos autográficos que al combinar técnicas de separación cromatográfica con ensayos de análisis de actividad biológica, permiten la localización en una placa cromatográfica del o de los constituyente/s activo/s de una mezcla. De esta forma se logra un *screening* rápido de un gran número de muestras, con la posibilidad de realizar el posterior aislamiento biodirigido de los compuestos activos (fraccionamiento bioguiado).<sup>48</sup>

El procedimiento general por el cual se llevan a cabo estas técnicas consiste en la siembra del compuesto o la mezcla a evaluar en una placa de cromatografía en capa delgada (CCD). Luego del desarrollo de la misma en un sistema de solventes adecuado, se revela la placa mediante la aplicación de un medio en el cual se desarrolla algún proceso biológico o

químico representativo de alguna actividad biológica. De ser necesario, estos procesos son acoplados a una reacción que produzca un cambio de coloración detectable a simple vista o por medio de análisis digital de imágenes. De esta forma los cambios de coloración detectados en algún punto de la placa dan cuenta de la presencia del/los compuesto/s activo/s.

Existen diferentes tipos de autografías que pueden ser clasificadas en tres grupos según el tipo de proceso que ocurre en el medio revelador:

- ✓ autografías a célula entera o bioautografías,
- ✓ autografías macromoleculares o enzimáticas,
- ✓ autografías químicas.

Las autografías a célula entera o bioautografías fueron las primeras en desarrollarse, los inicios de esta asociación entre un ensayo biológico y una cromatografía planar datan del año 1946, cuando Goodwall y Levi usaron cromatografía en papel en un método de detección bioautográfico de contacto,<sup>49</sup> para la determinación de impurezas en distintas penicilinas. Cincuenta años después, Fisher y Lautner,<sup>50</sup> y posteriormente Nicolaus<sup>51</sup> introdujeron la CCD en este mismo campo. Tres métodos bioautográficos fueron descritos para la investigación de actividad antimicrobiana: bioautografía de contacto o de difusión en agar, bioautografía directa y bioautografía sobre agar.<sup>52</sup> Estos métodos están basados en la medición de actividades biológicas tales como antibacteriana, antifúngica, antitumoral y antiprotozoaria.<sup>53</sup> Más recientemente se han comenzado a utilizar bioautografías para medir propiedades que van más allá del crecimiento o no del organismo utilizado, como por ejemplo el ensayo para detección de inhibidores de la actividad reguladora de la virulencia de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (represión del sistema PhoP/PhoQ)<sup>54</sup> y el ensayo para determinación de actividad estrogénica.<sup>55</sup>

Por su parte, las enzimas representan importantes blancos farmacológicos, por lo que el desarrollo métodos autográficos que permitan la detección de inhibidores enzimáticos es un elemento atractivo en el campo del descubrimiento de fármacos. En estos métodos autográficos enzimáticos, la placa cromatográfica suele ser sumergida en (o rociada con) una solución de enzima y una de sustrato (algunas veces también colorante) para dar halos de diferente color respecto del fondo de la placa.<sup>56</sup> El ensayo autográfico enzimático más popular es el de detección de inhibidores de acetilcolinesterasa, inicialmente basado en la reacción de Ellman.<sup>57,58,59</sup> Posteriormente, Hostettmann y colaboradores desarrollan un método que se

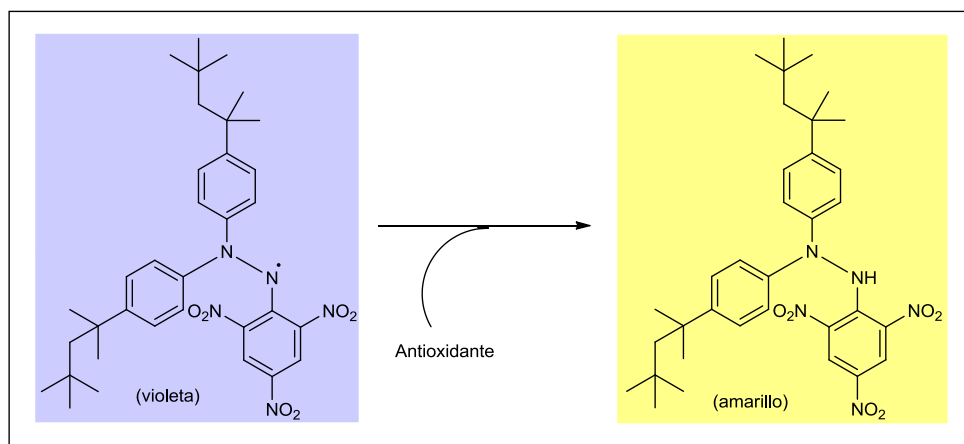
basa en la hidrólisis de acetato de 1-naftilo catalizada por la enzima acetilcolinesterasa.<sup>60, 61</sup> Recientemente, se han desarrollado otros ensayos para detección de inhibidores de las enzimas lipasa,<sup>62, 63</sup> tirosinasa,<sup>64</sup>  $\alpha$  y  $\beta$ -glucosidasa<sup>65,66</sup> y xantina oxidasa<sup>67</sup> en algunos de los cuales se introduce agar como soporte del medio revelador.

Las autografías químicas reportadas en la actualidad se utilizan básicamente para la determinación de actividad antioxidante. Los antioxidantes actúan contra el daño oxidativo causado por radicales libres y especies afines y han atraído mucha atención en los últimos años. Estas especies reactivas provienen principalmente del oxígeno y del nitrógeno, se generan en nuestro cuerpo por varios sistemas endógenos, la exposición a diferentes condiciones fisicoquímicas o estados fisiopatológicos.<sup>68</sup> Estas especies reactivas han sido relacionadas con enfermedades degenerativas producto del daño oxidativo como cáncer y policitemia.<sup>69</sup> Por otra parte, los antioxidantes, se han relacionado en estudios epidemiológicos con la reducción en la incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes.<sup>70</sup> Esto señala la importancia biológica de los antioxidantes y la necesidad del descubrimiento de nuevos compuestos antioxidantes de diversas fuentes. Varios ensayos han sido reportados para evaluar la capacidad captadora de numerosos radicales libres incluyendo 2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH), catión radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfónico) (ABTS), peroxilo, anión radical superóxido ( $O_2^-$ ) y radical hidroxilo,<sup>71</sup> los métodos autográficos reportados se basan principalmente en la medición de la capacidad captadora de especies reactivas tales como DPPH<sup>72</sup> y radical anión superóxido.<sup>17</sup>

### ***1.5.1 Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH***

El DPPH es un radical sintético estable. Esta estabilidad es debida a la deslocalización del electrón desapareado por toda la molécula que impide la dimerización, como sucede para la mayoría de los otros radicales libres. Esta deslocalización es la responsable de originar el color violeta que lo caracteriza. Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno, se origina la forma reducida del DPPH. La coloración violeta se pierde y prevalece la coloración amarilla del grupo picrilo presente.<sup>73</sup>

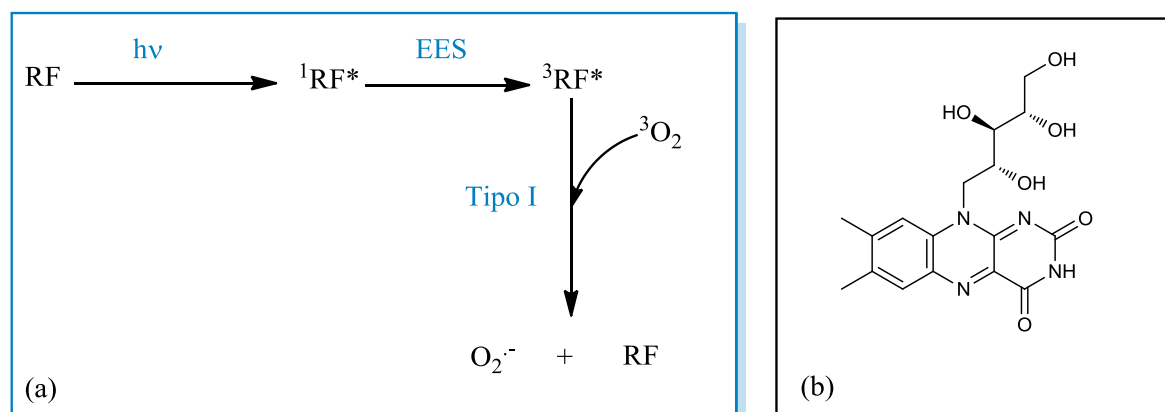
La autografía consiste en rociar sobre la placa cromatográfica una solución etanólica de DPPH. Luego de un determinado tiempo los compuestos antioxidantes se observan como puntos amarillos en una matriz violeta.<sup>74, 75</sup> **(Figura 5)**



**Figura 5.** Reacción de captación del radical DPPH por parte de compuestos antioxidantes

### 1.5.2 Detección de compuestos antioxidantes captadores de anión superóxido

Cuando una molécula de riboflavina (RF) absorbe un fotón, forma el singlete excitado  $^1\text{RF}^*$  que luego de un entrecruzamiento entre sistemas forma el triplete excitado  $^3\text{RF}^*$ . Esta última especie reacciona con oxígeno triplete ( $^3\text{O}_2$ ) generando  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y RF como productos (**Figura 6**).<sup>76, 77</sup>



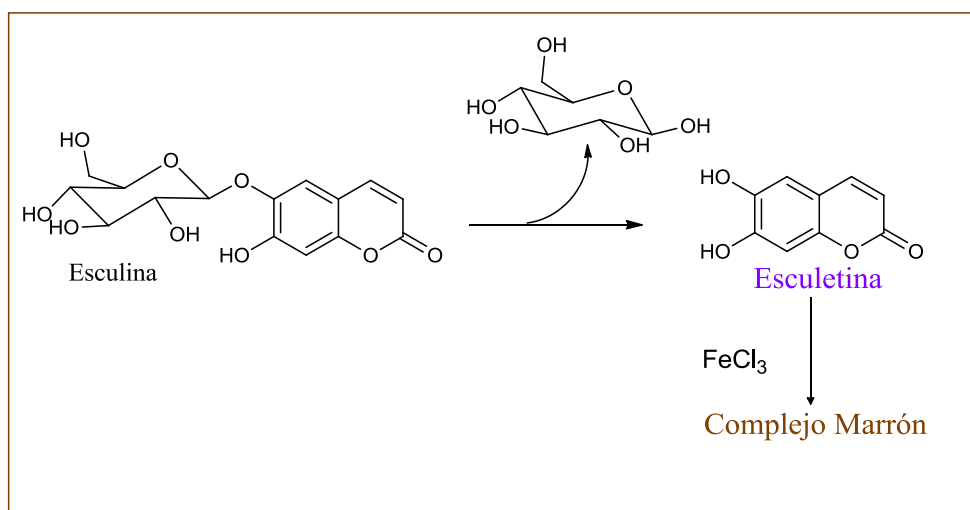
**Figura 6.** (a) Esquema de generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por fotoreacción de la riboflavina; (b) estructura de la riboflavina.

La autografía basada en el sistema riboflavina/luz consiste en el depósito sobre una placa cromatográfica de un gel que contiene una mezcla de riboflavina, colorante azul de nitrotetrazolio (NBT) y el catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). La placa con el gel es expuesta a luz fluorescente durante unos minutos. De esta forma la luz inicia el proceso de generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  cuya presencia es detectada por reacción con NBT, que cambia de color al reaccionar con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Aquellos compuestos que secuestran el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  del medio se observan en la autografía como puntos claros en una matriz violeta.

### 1.5.3 Detección de actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -Glucosidasa

La enzima  $\beta$ -glucosidasa cataliza la hidrólisis de enlaces tipo  $\beta$  de polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y heterósidos, por lo cual pertenece al grupo de las hidrolasas. Estas enzimas se encuentran involucradas en varios procesos biológicos importantes tales como digestión, biosíntesis de glicoproteínas y catabolismo lisosomal de glicoconjugados por lo que sus inhibidores son sujeto de gran interés<sup>78</sup> debido a su potencial como drogas para el tratamiento de cáncer,<sup>79</sup> diabetes,<sup>80</sup> infección viral,<sup>81,82</sup> obesidad<sup>83</sup> y enfermedades hereditarias de depósito lisosomal.<sup>84</sup>

Para evaluar esta actividad se llevó a cabo una autografía basada en la reacción de  $\text{FeCl}_3$  con esculetina (producto de la hidrólisis catalizada enzimáticamente de esculina, **Figura 7**).<sup>65</sup> El procedimiento general consiste generar, sobre la placa cromatográfica, un gel de agar que contiene la enzima y el revelador (solución de  $\text{FeCl}_3$ ). Posteriormente la placa con el gel es sumergida en una solución de sustrato para activar el proceso catalítico.

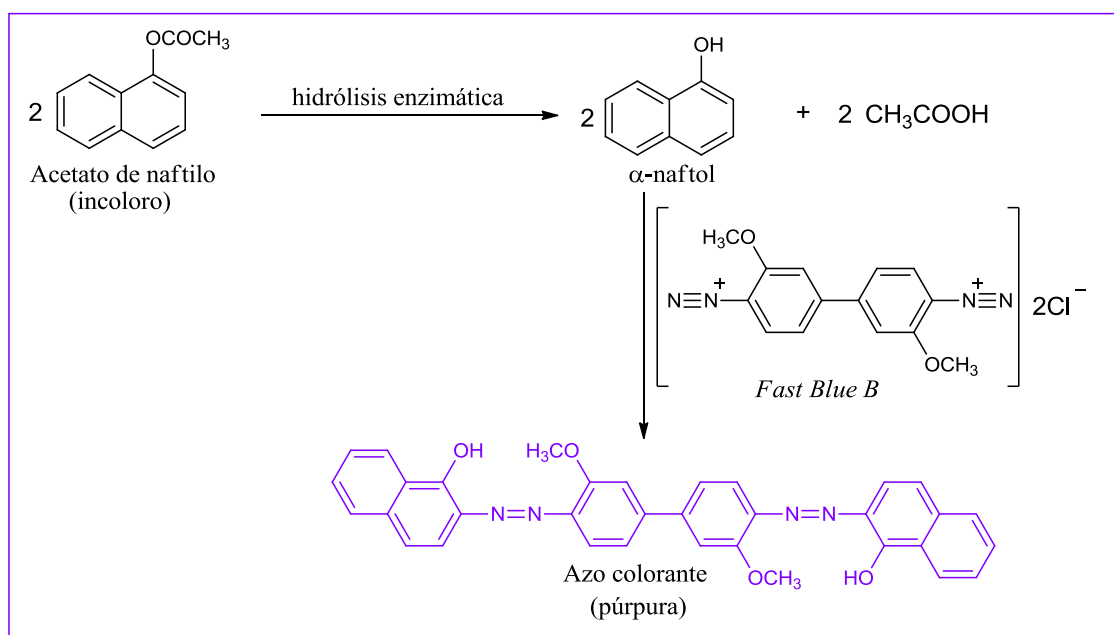


**Figura 7.** Reacción de detección de inhibidores de enzima  $\beta$ -glucosidasa.

### 1.5.4 Detección de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa

La enzima acetilcolinesterasa cataliza la degradación de la acetilcolina, uno de los principales mecanismos involucrados en el origen de la enfermedad de Alzheimer es la falta de este neurotransmisor, el cual tiene una incidencia considerable en los procesos cerebrales y funciones cognitivas. El hallazgo de inhibidores de esta enzima resulta de gran importancia para la medicina, por tal motivo es considerada un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad.<sup>85,86</sup>

Se han descrito varios métodos autográficos para la búsqueda de inhibidores de esta enzima a partir de mezclas; los dos más tradicionales son el desarrollado por el grupo de Verpoorte<sup>87</sup> y el desarrollado por el grupo de Hostettmann.<sup>60</sup> El ensayo desarrollado por Hostettmann y colaboradores se basa en la hidrólisis de acetato de naftilo catalizada por la enzima acetilcolinesterasa. El naftol producto de esta hidrólisis reacciona con *Fast Blue B* generando un derivado coloreado (**Figura 8**).



**Figura 8.** Reacción de detección de actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Método de Hostettmann).

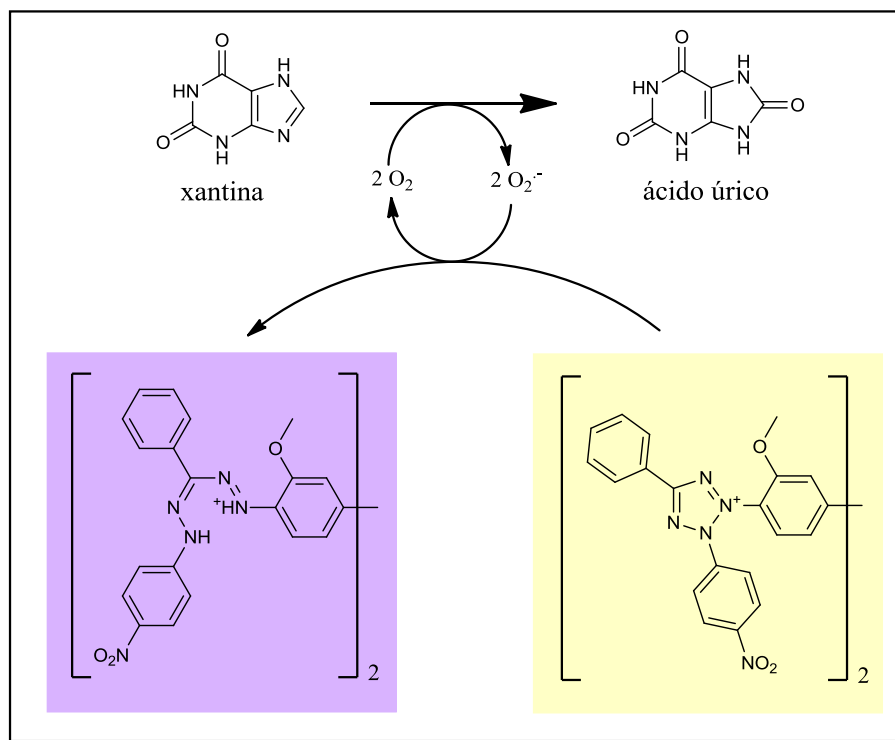
El ensayo consiste en el rociado de una solución de la enzima sobre la placa cromatográfica que, luego de un período de incubación, es seguido por la aplicación por rociado de una solución de acetato de naftilo y *Fast Blue B*. Los compuestos inhibidores se observan como puntos claros en una matriz púrpura. Para biomonitorrear las propiedades inhibitorias de acetilcolinesterasa de los extractos modificados utilizamos este ensayo autográfico con algunas modificaciones introducidas por el grupo,<sup>88</sup> las cuales consisten en rociar inicialmente la placa con una solución de acetato de naftilo y *Fast Blue B* y en depositar a continuación una solución acuosa de enzima y agar (inmovilización de la enzima en un gel de agar). Finalmente, el sistema se deja a temperatura ambiente hasta que el gel se colorea de violeta.

### 1.5.5 Detección de actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa

La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico, generándose las especies reactivas de oxígeno anión radical superóxido

y peróxido de hidrógeno. Estas especies están asociadas a patologías tales como inflamación, aterosclerosis, cáncer, etc.<sup>89,90,91</sup> Algunas de estas patologías se encuentran asociadas a niveles de XO superiores al normal, por lo que una forma de tratarlas sería la inhibición del proceso catalizado por esta enzima.

La autografía sobre placa delgada para detectar inhibidores de la enzima XO consiste en depositar sobre una placa cromatográfica una solución que contiene una mezcla de la enzima, un agente gelificante (agar) y el revelador NBT.<sup>67</sup> Una vez que se forma el gel la placa se incuba y posteriormente se sumerge en una solución del sustrato xantina. Después de unos minutos, el gel toma una coloración violeta dada por un compuesto del tipo formazán, el cual se genera por la reducción del NBT debido a la acción del superóxido que se genera en el proceso catalítico (**Figura 9**). Los compuestos inhibidores se observan como puntos claros en una matriz violeta.



**Figura 9.** Oxidación de xantina a ácido úrico catalizada por la XO y subsecuente detección del  $\text{O}_2^-$  generado con NBT.

Si bien el  $\text{O}_2^-$  es un buen indicador de la actividad de la XO, su utilización puede llevar a falsos positivos: un compuesto presente en la placa cromatográfica que sea capaz de reaccionar con  $\text{O}_2^-$  a una velocidad similar o mayor que NBT también quedara evidenciado como una mancha clara. En este caso, el halo observado no correspondería a una disminución

de la actividad enzimática sino a una disminución de la cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  del medio de reacción. Para poder diferenciar estas actividades se utiliza como control el ensayo para antioxidantes captadores de superóxido basado en riboflavina mencionado en la **Sección 1.5.2**.

### **1.5.6 Detección de actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa**

La tirosinasa o polifenol oxidasa (PPO) es una enzima bifuncional cuprífera ampliamente distribuida en microorganismos, plantas y animales que cataliza la producción de melanina y otros pigmentos, por oxidación de L-tirosina.<sup>92</sup> En su primera reacción, actividad monooxigenasa (cresolasa), la enzima cataliza la hidroxilación de un sustrato fenólico en la posición *orto* al grupo hidroxilo. En una segunda reacción, actividad oxidasa (catecolasa), el compuesto *o*-hidroxi es oxidado a su derivado *o*-quinona. Estos derivados a su vez, sufren una serie de reacciones químicas y enzimáticas y finalmente polimerizan.<sup>93</sup>

La tirosinasa es conocida por ser una enzima clave en la biosíntesis de melanina, la cual es la responsable de la coloración del cabello y la piel en mamíferos. Diversos trastornos dermatológicos, tales como melasma, manchas de la edad y sitios de daño actínico, surgen a partir de la acumulación de un nivel excesivo de pigmentación epidérmica.<sup>94</sup> Además ha despertado gran interés la implicancia de la melanina en el melanoma maligno, un tipo de tumores cutáneos de alto índice de mortalidad. La tirosinasa es también responsable del pardeamiento enzimático indeseado de frutas y verduras<sup>95</sup> que se produce durante la senescencia<sup>i</sup> o luego de daños en el momento de la manipulación post-cosecha, lo que hace que la identificación de nuevos inhibidores de tirosinasa sea importante para mantener la calidad de estos alimentos hasta la llegada al consumidor. Por otro lado, la tirosinasa también estaría involucrada en la cicatrización de heridas, en la encapsulación de parásitos y en la esclerotización en insectos.<sup>96</sup>

Por todo esto, el descubrimiento de nuevos inhibidores de tirosinasa resulta atractivo por sus potenciales aplicaciones para la mejora del valor nutricional y la calidad de alimentos,

---

<sup>i</sup> Referido a la última etapa del desarrollo vegetal, es un proceso que se caracteriza por presentar una tasa de respiración más acelerada, una menor eficiencia fotosintética, y una disociación o desarmamiento de las macromoléculas que componen las células vegetales, lo cual le permite a la planta recuperar nutrientes desde células que han alcanzado el final de vida útil para así distribuirlos a otros órganos florales que demandan energía.

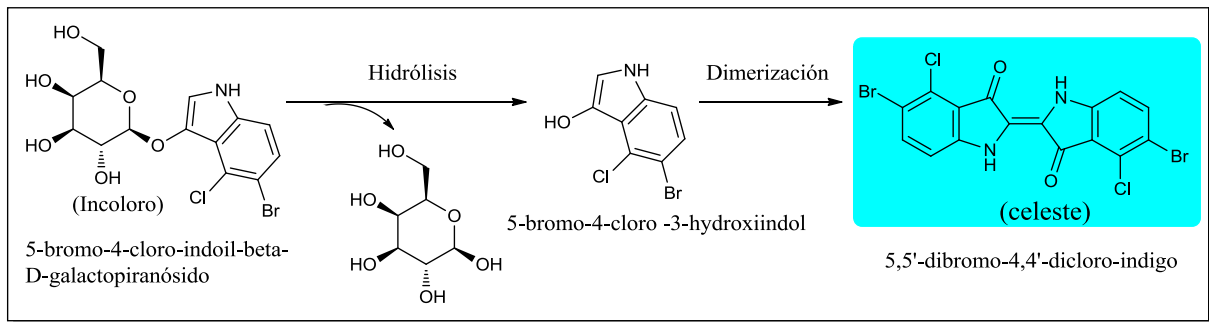
el control de plagas de insectos, la prevención y el tratamiento de desórdenes de pigmentación y de otros problemas de salud relacionados con la melanina en humanos. Sin embargo, sólo algunos agentes antimelanogénicos, como ácido kójico y arbutina, están hoy en día disponibles comercialmente. Los mismos poseen elevada toxicidad celular y baja estabilidad frente al oxígeno y al agua, lo que limita sus aplicaciones.<sup>94</sup>

Hasta el momento se ha reportado solamente una autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa.<sup>64</sup> En nuestras manos, la misma presentó bajas reproducibilidad y resolución de los halos de inhibición, y alta dificultad operativa. Esto nos llevó a desarrollar un ensayo autográfico sobre placa delgada para la detección de inhibidores de la enzima tirosinasa, que sea de más fácil aplicación.

### ***1.5.7 Detección de inhibidores de la actividad reguladora de la virulencia de Salmonella (represión del sistema PhoP/PhoQ).***

En este ensayo bioautográfico se utiliza una cepa de Salmonella conteniendo una fusión transcripcional *LacZ* a un gen activado *phoP*, que permite evaluar si los compuestos presentes en las mezclas producen la expresión o represión del sistema *phoP/phoQ*. Este sistema regulatorio controla la expresión de numerosos fenotipos de patogenicidad. Para el desarrollo se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con una fusión transcripcional del gen *lacZ* a un gen *virK* representativo del PhoP activo. Los compuestos que reprimen el sistema PhoP/PhoQ disminuirán la expresión del reportero *lacZ* y por lo tanto la producción de  $\beta$ -galactosidasa.

El fundamento químico de este ensayo es la hidrólisis catalizada por  $\beta$ -galactosidasa del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, la cual se produce bajo condiciones de desarrollo normal de la bacteria (sistema PhoP/PhoQ no inhibido), luego el producto de esta reacción se dimeriza y oxida espontáneamente generando un producto coloreado celeste, el 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo. Inhibidores del sistema PhoP/PhoQ de *Salmonella* inhibirán la producción de  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto del producto coloreado, por lo que son detectados como halos incoloros en una matriz celeste (**Figura 10**).



**Figura 10.** Reacción de detección de inhibidores de la actividad reguladora de la virulencia de *Salmonella*.



## **2.OBJETIVOS**



## **2.1 *Objetivos generales***

Continuar con el desarrollo de condiciones de preparación y de análisis de extractos modificados químicamente como fuente de compuestos semisintéticos bioactivos.

## **2.2 *Objetivos específicos***

- Modificación química de extractos a través de reacciones de halogenación.
- Evaluación del impacto de las reacciones sobre la composición química de los extractos por métodos cromatográficos, espectroscópicos o combinaciones de éstos.
- Evaluación del impacto de las reacciones sobre las propiedades biomoleculares de las mezclas.
- Aislamiento bioguiado y elucidación estructural de compuestos semisintéticos halogenados activos.



## **3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### ***3.1 Desarrollo de nuevas herramientas autográficas para detección de inhibidores enzimáticos***

Como se mencionara en la **Sección 1.5**, los ensayos autográficos son herramientas de gran utilidad para evaluar la actividad biológica de mezclas complejas y para guiar el aislamiento de compuestos bioactivos presentes en esas mezclas.

La principal dificultad en el desarrollo de este tipo de ensayos enzimáticos es encontrar las condiciones adecuadas para lograr buena reproducibilidad y homogeneidad de color, buena definición de halos y ausencia de resultados falsos (positivos o negativos). Estos problemas suelen tener origen en distintos factores, principalmente relacionados con la estrategia utilizada para depositar tanto la enzima como el sustrato sobre el soporte sólido (principalmente rociado sobre la CCD). Por lo cual en esta sección se estudian las ventajas del uso de geles como soportes enzimáticos para resolver en parte estos problemas.

Por otra parte, el desarrollo de este tipo de ensayos suele implicar la evaluación simultánea del efecto de numerosas variables (pH; tiempo y temperatura de incubación, concentración de sustrato y de enzima, etc). Tradicionalmente, durante la etapa de puesta a punto de estos ensayos se utiliza el método OVAT (una variable a la vez del inglés *One Variable At a Time*), el cual suele requerir numerosos experimentos para llegar al óptimo deseado. Por lo que para llevar a cabo el desarrollo de nuevas herramientas autográficas, se decidió utilizar diseño experimental y métodos de optimización multicriterio (Métodos de Superficie de Respuesta y uso de funciones de deseabilidad), con el objetivo de aumentar la sensibilidad de los ensayos y de disminuir el límite de detección para inhibidores conocidos de las enzimas realizando un mínimo número de experimentos. Además, estas herramientas permiten diseñar criteriosamente los experimentos a desarrollar y predecir máximos absolutos, provenientes de un compromiso entre las variables evaluadas, en vez de máximos relativos obtenidos por los métodos clásicos.

#### ***3.1.1 Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de tirosinasa***

Por lo explicado en la **Sección 1.5.6** el descubrimiento de nuevos inhibidores de tirosinasa resulta atractivo por sus potenciales aplicaciones para la mejora del valor nutricional y la calidad de alimentos, el control de plagas de insectos, la prevención y el tratamiento de desórdenes de pigmentación y de otros problemas de salud relacionados con la

melanina en humanos. Sin embargo, sólo algunos agentes antimelanogénicos, como ácido kójico y arbutina, están hoy en día disponibles comercialmente. Los mismos poseen elevada toxicidad celular y baja estabilidad frente al oxígeno y al agua, lo que limita sus aplicaciones.<sup>94</sup>

Hasta el momento de comienzo de este trabajo de tesis, se había reportado solamente un ensayo autográfico para la detección de inhibidores de tirosinasa.<sup>64</sup> En nuestras manos, el mismo presentó baja reproducibilidad y resolución de los halos de inhibición, y alta dificultad operativa. Esto nos llevó a desarrollar un ensayo autográfico sobre placa delgada para la detección de inhibidores de la enzima tirosinasa, que sea de más fácil aplicación.

En términos generales el desarrollo de un ensayo autográfico enzimático demanda: una pareja sustrato/producto que permita detectar colorimétricamente la presencia de actividad enzimática (con o sin agregado de colorante) y mantener la actividad de la enzima sobre la placa cromatográfica por el tiempo necesario para catalizar la formación de suficiente producto para ser detectado.

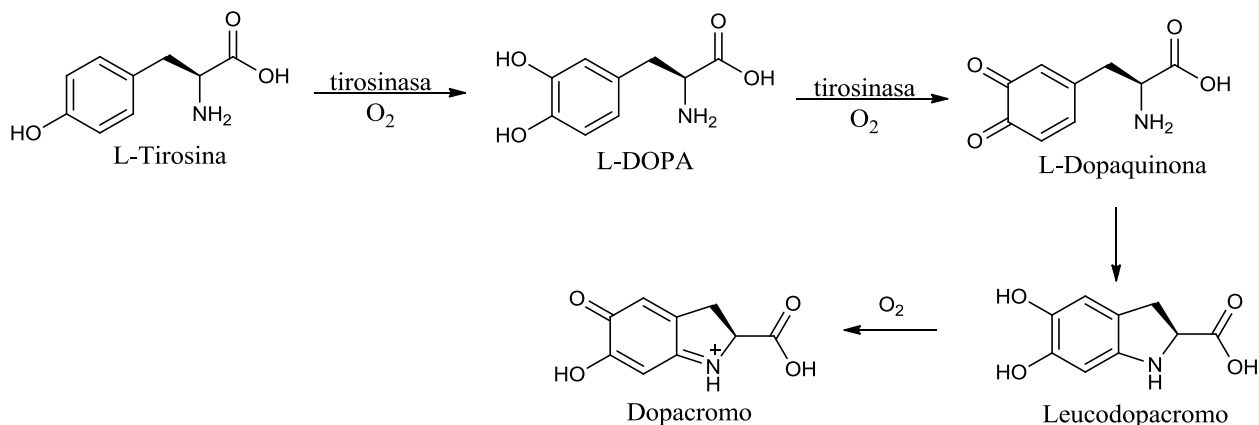
### 3.1.1.1 Selección de un sustrato apropiado

Existen varias formas de detectar la actividad enzimática de tirosinasa, entre las cuales podemos mencionar a las mediciones colorimétricas, manométricas, cronométricas, radiométricas, electroquímicas (basada en la detección del consumo de oxígeno) y la medida de la corriente de oxidación de L-DOPA y L-tirosina.

La detección colorimétrica de actividad de tirosinasa es la más apropiada para un formato autográfico debido a que en este formato de ensayos es necesario observar a simple vista un cierto contraste entre el color del sustrato y el color del o de los productos generados por la acción catalítica de la enzima. Esto implica que al menos uno de ellos (sustrato, producto/s o sus derivados) debe poseer una longitud de onda de absorción en el rango del visible (380 a 780 nm).

Se han descrito numerosos sustratos para la enzima tirosinasa,<sup>97</sup> pero en su mayoría los productos obtenidos absorben a longitudes de onda menores a 400 nm. Dentro de los escasos sustratos que dan lugar a la formación de productos coloreados se encuentran dos de sus sustratos naturales: L-tirosina y L-DOPA. Estos son sustratos para la actividad cresolasa (hidroxilación de monofenoles) y catecolasa (oxidación de difenoles a quinonas), respectivamente. El producto obtenido a partir de ambos sustratos es la misma misma *o*-

quinona debido a que L-DOPA es producto de la primera reacción y sustrato de la segunda (**Figura 11**). Esta *o*-quinona, dopaquinona, se transforma espontáneamente en dopacromo que absorbe a 480 nm,<sup>98</sup> por lo tanto L-tirosina como L-DOPA serían sustratos atractivos para el desarrollo de un ensayo autográfico. En los ensayos siguientes se utilizó como sustrato a la L-tirosina.



**Figura 11.** Reacciones catalizadas por la enzima tirosinasa a partir de su sustrato natural L-tirosina.

### 3.1.1.2 Selección de condiciones para la reacción enzimática sobre la placa cromatográfica

Dentro de los principales métodos de aplicación de enzimas sobre CCD se encuentran el rociado directo sobre la placa cromatográfica de una solución de la enzima y la inmovilización por atrapamiento físico en un gel. El primero de estos métodos consiste en rociar la placa cromatográfica con una solución de la enzima en un buffer apropiado y ha sido utilizado para el desarrollo de la autografía reportada para inhibidores de tirosinasa.<sup>64</sup> Esta forma de agregado de enzima es rápida y sencilla pero suele presentar problemas de reproducibilidad principalmente relacionados al rociado de un medio acuoso sobre la placa. Por un lado, resulta difícil aplicar una capa homogénea de una solución o suspensión sobre la placa cromatográfica de manera reproducible. Además, el rociado de un medio acuoso suele producir una pérdida de resolución de los halos, cuyos bordes se vuelven difusos.

El uso de geles de agar en ensayos sobre placas cromatográficas tiene como antecedentes las bioautografías destinadas a medir actividad antimicrobiana.<sup>99</sup> Su utilización en autografías enzimáticas es más reciente y sólo encuentra dos ejemplos. En uno de ellos la enzima xantina oxidasa fue inmovilizada en geles de agar o de agarosa<sup>67</sup> y en el otro la enzima  $\beta$ -glucosidasa fue inmovilizada en gel de agar.<sup>65</sup> Cuando se utiliza esta estrategia de aplicación, la enzima es depositada sobre la placa cromatográfica como una suspensión que

contiene también un agente gelificante, por lo que se forma un gel de entre 1 y 2 mm de espesor. Dentro de las ventajas de este método pueden mencionarse la posibilidad de utilizar menor cantidad de enzima y la mayor facilidad para lograr aplicaciones homogéneas de la enzima sobre la superficie de la placa cromatográfica, permitiendo conocer la concentración de enzima por unidad de área de placa. Además, generalmente se observa mayor resolución de los halos de inhibición debido a que se evita el rociado de la placa cromatográfica con un buffer acuoso. La utilización de agar como agente gelificante tiene las ventajas de su bajo costo y de la excelente estabilidad de sus geles. Por otro lado presenta como desventajas la necesidad de someter a la enzima a un cierto estrés térmico y la falta de adherencia que presentan sus geles frente a superficies hidrofóbicas.

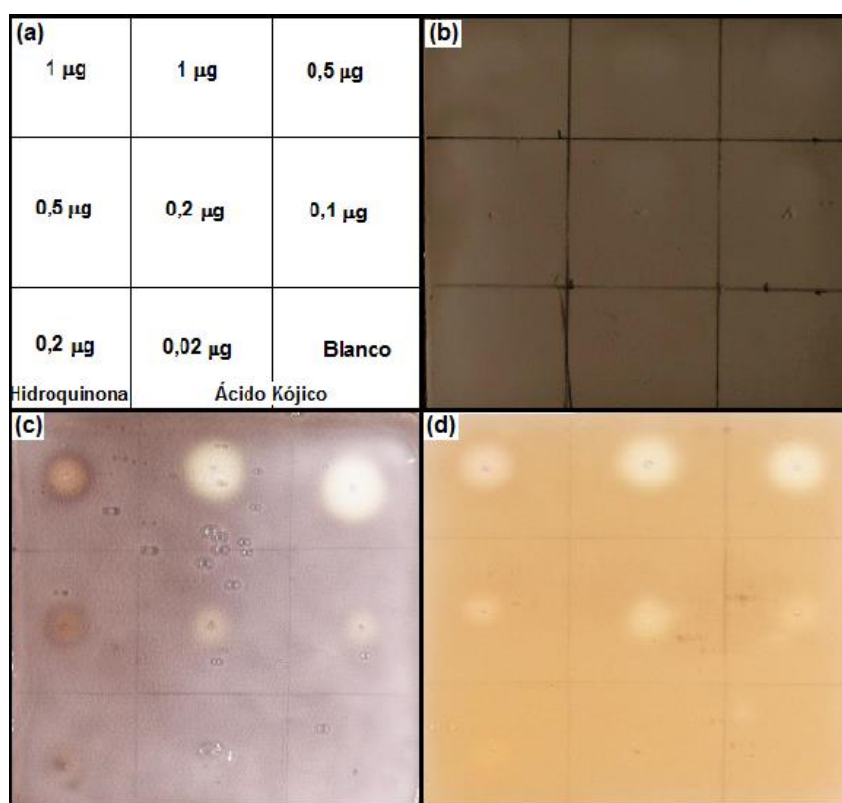
Los poloxámeros son copolímeros de tres bloques no iónicos compuestos de una cadena central hidrofóbica de polioxipropileno (poli (óxido de propileno)) con dos cadenas hidrofílicas de polioxietileno (poli (óxido de etileno)) en sus extremos. La presencia de estos bloques da lugar a moléculas con la capacidad de formar micelas dependientes de la temperatura. La formación de micelas permite la solubilización de compuestos hidrofóbicos, por lo que estos copolímeros resultan atractivos para la disolver compuestos poco solubles en agua. Las soluciones acuosas de poloxámero 407 en concentraciones de 20 % P/V o superiores, presentan un interesante comportamiento de gelificación termorreversible. Son soles por debajo de la temperatura ambiente y se convierten en geles a temperatura corporal (37,2 °C). Además, se ha reportado que los poloxámeros presentan efectos positivos en la conservación de enzimas frente a estrés alcalino, dificultan su agregación y aumentan de su estabilidad térmica.

Inicialmente se compararon el rociado directo y la aplicación de geles como métodos para depositar sobre una placa cromatográfica una cantidad de enzima tirosinasa suficiente para producir la oxidación de cantidades detectables del sustrato L-tirosina (**Figura 12**). Además se sembraron sobre las placas cromatográficas distintas concentraciones de dos inhibidores conocidos (hidroquinona y ácido kójico, **Figura 12a**) para evaluar, además de la coloración, el contraste generado y la definición de los halos.

Para la aplicación de la enzima por rociado directo utilizando L-tirosina como sustrato se siguió el protocolo del método reportado por Wangthong y col.<sup>64</sup> Paralelamente, se evaluó el atrapamiento de la enzima en dos sistemas gelificantes, una solución de poloxámero 407 y una solución de agar. En el caso de atrapamiento en gel las concentraciones finales de enzima

y de sustrato en el gel fueron iguales que las concentraciones de las soluciones utilizadas en los ensayos por rociado directo. Asimismo el volumen de gel usado en ambos casos es el mismo que el volumen de solución rociada en el otro formato de ensayo para que los tres procedimientos sean comparativos.

Si bien la coloración obtenida cuando la enzima se roció directamente sobre la placa (**Figura 12b**) fue mayor que cuando la enzima se inmovilizó en alguno de los geles (**Figura 12c y d**), el rociado produjo menor contraste y halos más difusos, dificultando la visualización de los inhibidores. El uso de poloxámero 407 (**Figura 12c**) dio lugar a la formación de geles más intensamente coloreados y halos con mayor definición y contraste que aquellos en los que se utilizó agar (**Figura 12d**), sin embargo las autografías utilizando agar resultaron operativamente más sencillas y los geles de agar mostraron mayor robustez frente al manipuleo. Además, como puede observarse en la **Figura 12d**, la coloración del gel es más uniforme lo cual aumenta la reproducibilidad del ensayo. Esto nos llevó a proseguir con la aplicación de la enzima inmovilizada por atrapamiento en gel de agar.



**Figura 12.** Evaluación de soportes para tirosinasa. **(a)** Esquema de siembra de inhibidores en la placa cromatográfica; **(b)** ensayo con aplicación por rociado; **(c)** ensayo con gel de poloxámero 407 y **(d)** ensayo con gel de agar. Todas las imágenes fueron capturadas a los 20 minutos de exposición.

### 3.1.1.3 Diseño experimental de fase *screening* y de fase optimización

Los modelos de diseño experimental son modelos estadísticos clásicos cuyo objetivo es averiguar si determinados factores influyen en una variable de interés y, en el caso de existir influencia de algún factor, cuantificar dicha influencia. Se define como factor a toda aquella variable que puede controlarse para estudiar su efecto sobre un proceso o producto que tiene (o podría tener) influencia sobre las características analizadas. Se define como respuesta, a ciertas características del proceso o producto a ser optimizado, por lo tanto es una variable que describe el desempeño del sistema en estudio.

Es esperable que la sensibilidad y el límite de detección del ensayo autográfico a desarrollar dependan de varios factores, por lo que el estudio simultáneo de todos los potenciales factores resulta complejo. Por lo tanto, se construyó un diseño experimental Plackett-Burman. Este es un diseño completamente ortogonal que en casos como este, en los que el número de variables es potencialmente elevado, reduce substancialmente el número mínimo de experimentos requeridos.<sup>100</sup> Su condición de completa ortogonalidad entre las variables y el número reducido de experimentos cuando se trabaja con muchos factores hacen ventajoso a este tipo de diseño con respecto a otros diseños de *screening* (factoriales completos, factoriales fraccionarios y Taguchi).<sup>101</sup>

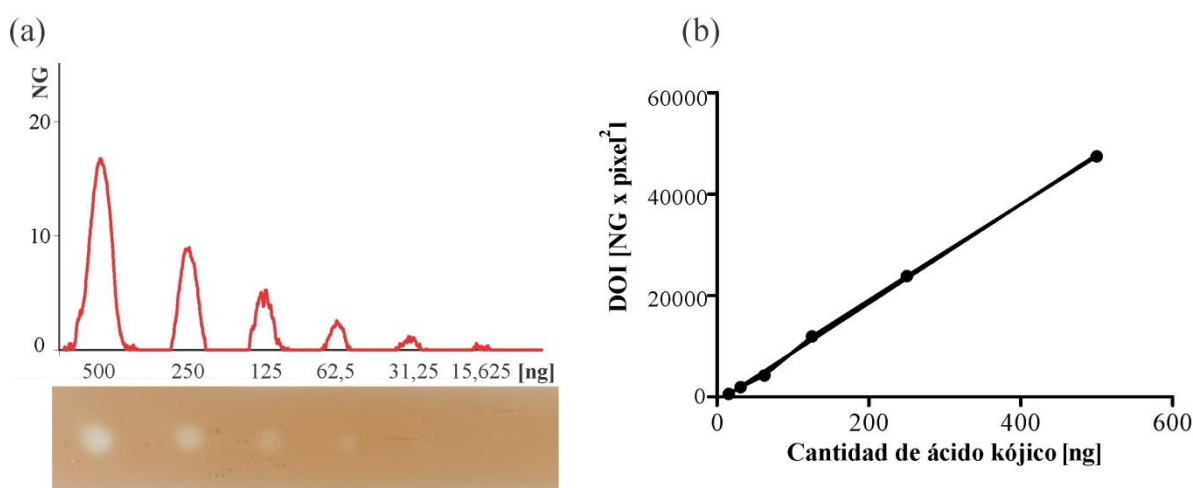
En el diseño de Plackett-Burman cada factor se coloca a 2 niveles y el número de experimentos  $N$  es múltiplo de 4. Las variables pueden ser de tipo cualitativa o cuantitativa. Los niveles se denotan como -1 y +1; pudiendo escribirse en forma simplificada como (-) y (+). La construcción de la matriz resulta sencilla: en la mayoría de los casos la primera línea de signos ya está dada y las restantes líneas se obtienen mediante permutaciones cíclicas sobre cada columna, excepto la última, en la cual se introducen todos con signo menos (-).

Utilizando este diseño se determinaron los principales factores que afectan a la sensibilidad y al límite de detección del ensayo autográfico enzimático, para luego evaluar, en la etapa de optimización, sólo aquellos factores que hayan resultado ser significativos para las respuestas seleccionadas.

### 3.1.1.4 Definición de respuestas a evaluar

Con el objeto de evaluar la sensibilidad y el límite de detección, se definieron cinco indicadores de respuesta:  $DOI_1$ ,  $DOI_2$ ,  $DOI_3$ ,  $K$  y  $UD$ . Los indicadores  $DOI_1$ ,  $DOI_2$  y  $DOI_3$  fueron definidos como la Densidad Óptica Integrada (DOI) obtenida para 500, 250 y

125 ng/punto de ácido kójico, respectivamente (**Figura 13a**). Estos indicadores dan cuenta de la intensidad de la señal producida por concentraciones conocidas del inhibidor de referencia y de cómo ésta varía al cambiar las concentraciones. La respuesta K es la pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la siembra en punto de cantidades decrecientes del inhibidor de la enzima y revelada con el medio revelador enzimático (**Figura 13b**). Esta pendiente da cuenta de la dependencia de la respuesta obtenida con respecto a la concentración. Cuanto mayor es esta pendiente, mejor es el método para diferenciar diferentes concentraciones de inhibidor. Por su parte la respuesta UD es el Umbral de Detección, definido como la cantidad de inhibidor a la cual la señal es igual a 0 y da idea de cuál es la mínima cantidad de inhibidor para la cual se podría esperar una señal.



**Figura 13.** (a) Densidad óptica para cada siembra en punto de ácido kójico medidos utilizando el programa Gel-Pro Analyzer .y (b) Gráfico de regresión lineal para la obtención de las respuestas K y UD.

La medición de la señal correspondiente para cada concentración de inhibidor se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes Gel-Pro Analyzer. La señal medida es la DOI, cuyas unidades son Nivel de gris  $\times$   $pixel^2$  en función de la cantidad de inhibidor ácido kójico (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Valores obtenidos a partir del programa de análisis digital de imágenes.

Cantidad de ácido kójico [ng]	DOI [NG x $pixel^2$ ]
500	47404
250	23808
125	11947
62,5	4232
31,25	1947
15,625	564

### 3.1.1.5 Fase *screening* de factores significativos

En una primera etapa fueron analizados 4 factores cuantitativos a 2 niveles: concentración de enzima (4 y 8 U/cm<sup>2</sup> de tirosinasa), concentración de sustrato (60 y 100 nmol/cm<sup>2</sup> de L-tirosina), tiempo de incubación (20 y 40 minutos) y temperatura de incubación (20 y 40 °C). El rango en el cual se evaluaron los factores se seleccionó en función del previo conocimiento del sistema en estudio.<sup>64</sup> Como se comentó anteriormente, para esta etapa se utilizó un diseño experimental Plackett-Burman, consistiendo en 12 experimentos realizados en orden aleatorio, como se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Diseño Experimental Plackett-Burman (a) Factores: Cantidad de tirosinasa (A), Cantidad de L-tirosina (B), Temperatura de incubación (C) y Tiempo de incubación (D). (b) Respuestas: pendiente de la recta de regresión lineal (K), umbral de detección (UD), Densidad Óptica Integrada (DOI) obtenida para 500 (IOD<sub>1</sub>), 250 (IOD<sub>2</sub>) y 125 (IOD<sub>3</sub>) ng/punto de ácido kójico.

Experimento	Factores <sup>a</sup>				Respuestas <sup>b</sup>				
	A	B	C	D	K	UD	IOD <sub>3</sub>	IOD <sub>2</sub>	IOD <sub>1</sub>
	U/cm <sup>2</sup>	nmol/cm <sup>2</sup>	°C	Minutos	NG x pixel <sup>2</sup> /ng	ng	NG x pixel <sup>2</sup>	NG x pixel <sup>2</sup>	NG x pixel <sup>2</sup>
1	4	60	40	40	87,29	15,07	7834,8	22543,0	41734
2	8	60	20	20	103,86	20,62	9537,6	23957,0	49984
3	4	100	40	20	49,37	7,50	5663,6	12659,0	24022
4	8	60	40	40	96,50	7,38	10477,0	24833,0	47049
5	8	100	20	40	91,49	113,00	4509,5	7416,8	37111
6	8	100	40	20	44,56	42,76	4661,5	7737,3	20871
7	8	100	20	40	64,90	85,26	4108,3	8398,0	27682
8	4	60	20	20	44,61	13,58	4661,5	10839,0	20871
9	4	100	40	40	49,77	23,41	4975,3	10733,0	23990
10	4	60	20	40	81,67	11,74	8957,7	20613,0	39393
11	4	100	20	20	49,27	11,58	4752,0	12901,0	23694
12	8	60	40	20	86,87	7,11	9677,3	20676,0	42663

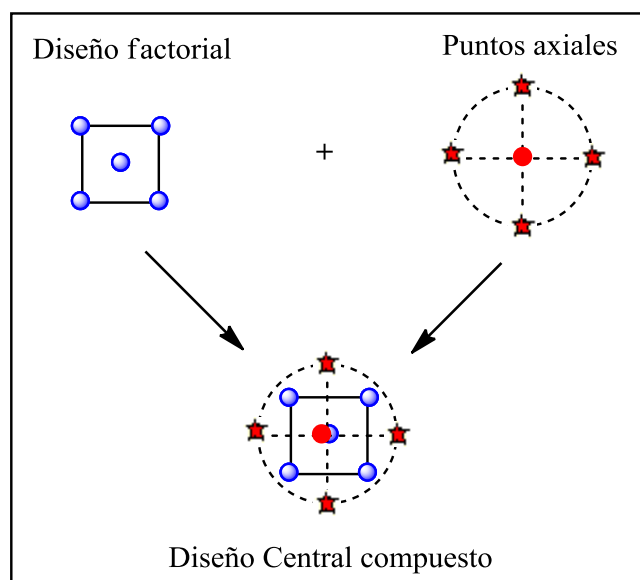
De la prueba ANOVA aplicada a los valores obtenidos experimentalmente, se puede concluir que la concentración de enzima y la concentración de sustrato son factores significativos ( $p < 0,05$ ), por lo que deben ser consideradas en la etapa posterior de optimización. Al contrario, el tiempo y la temperatura de incubación no afectan significativamente las respuestas en los rangos estudiados ( $p > 0,05$ ) por lo cual en la etapa de

optimización siguiente se utilizaran valores de estos factores que resulten convenientes y disminuyan el tiempo y la complejidad del ensayo.

### 3.1.1.6 Fase de optimización

Una vez establecido que la cantidad de tirosinasa y de L-tirosina influyen de manera significativa en las 5 respuestas analizadas, se llevó a cabo un procedimiento de optimización sistemático utilizando Métodos de Superficie de Respuesta (MSR). El objetivo de este paso de optimización es evaluar la relación entre las respuestas y los dos factores identificados como significativos, y de esta forma estimar los valores que deberán tomar estos factores para obtener valores máximos de K, DOI<sub>1</sub>, DOI<sub>2</sub> y DOI<sub>3</sub> y mínimo de UD.

Con este objetivo se utilizó un diseño central compuesto. El diseño central compuesto es el experimento diseñado de superficie de respuesta que más se utiliza. Este diseño fue presentado por Box y Wilson. Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales (puntos centrales y factoriales), ampliado con un grupo de puntos axiales (también llamados puntos estrella) que permiten estimar la curvatura (Figura 14). Las réplicas del centro contienen información acerca de la curvatura de la superficie, si la curvatura es significativa, los puntos axiales adicionales permiten obtener una estimación eficiente de los términos cuadráticos. Se puede utilizar un diseño central compuesto para estimar eficientemente los términos de primer orden y segundo orden.



**Figura 14.** Diagrama de diseño central compuesto para dos factores.

Para este caso en particular, el diseño consistió en 13 experimentos ( $2^2 = 4$  puntos de dos factores a dos niveles,  $2 \times 2 = 4$  puntos axiales y un punto central quintuplicado) (**Tabla 3**). Los cuales fueron combinaciones de las variables independientes (factores significativos seleccionados en la sección anterior) en los siguientes rangos:

- concentración de L-tirosina 40-100 nmol/cm<sup>2</sup> y
- concentración de tirosinasa 4-8 U/cm<sup>2</sup>.

Por otro lado el tiempo y la temperatura de incubación seleccionados fueron de 20 minutos y 20 °C, respectivamente. Todos los experimentos fueron realizados en un orden aleatorio con el objetivo de minimizar los efectos de factores no controlados que pueden introducir una tendencia en las medidas.

**Tabla 3.** Diseño central compuesto con 5 réplicas centrales (a) Factores: Cantidad de tirosinasa (A) y Cantidad de L-tirosina (B). (b) Respuestas: pendiente de la recta de regresión lineal (K), umbral de detección (UD), Densidad Óptica Ingrada (DOI) obtenida para 500 (IOD<sub>1</sub>), 250 (IOD<sub>2</sub>) y 125 (IOD<sub>3</sub>) ng/punto de ácido kójico.

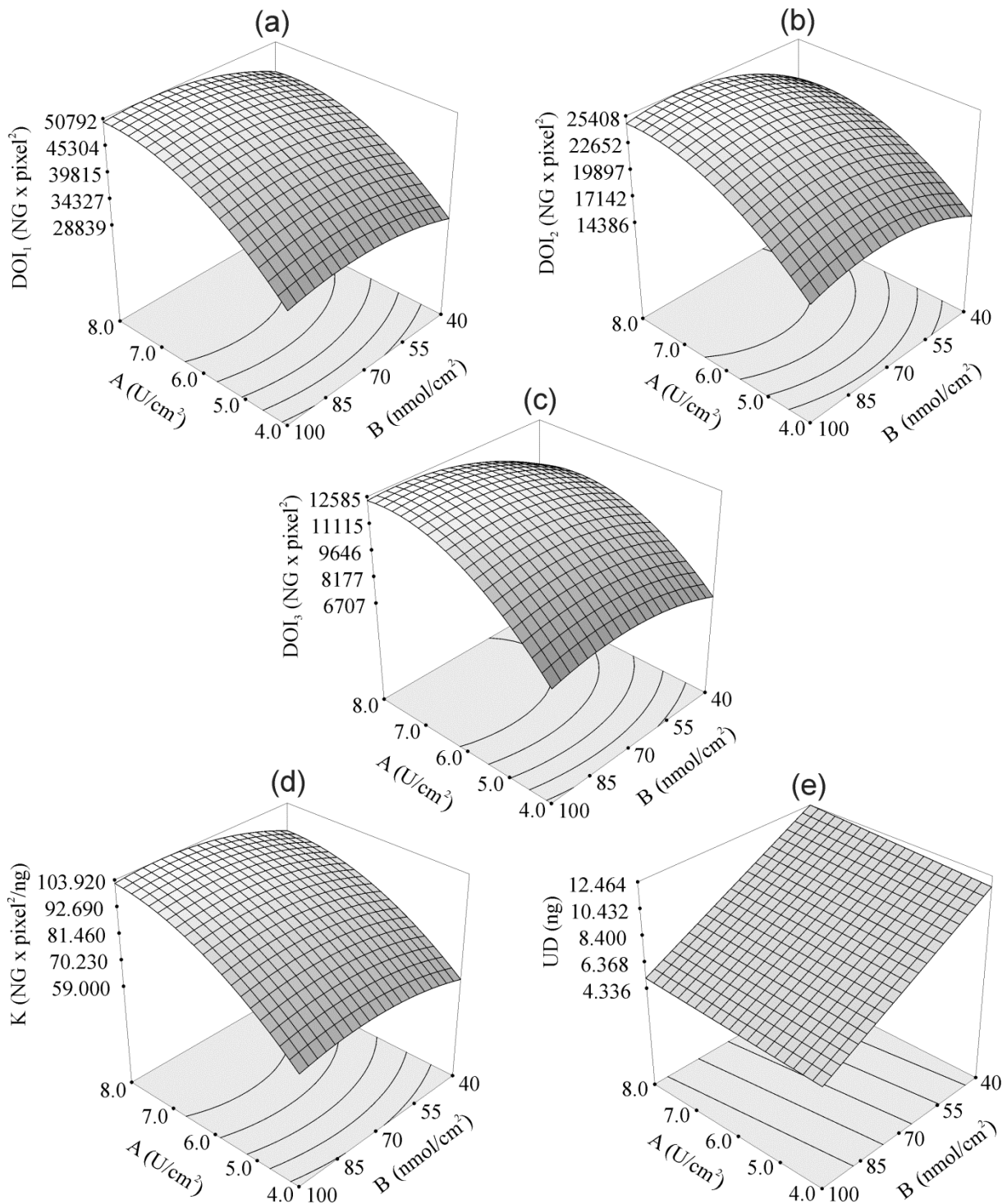
Experimento	Factores <sup>a</sup>		Respuestas <sup>b</sup>				
	A	B	K	UD	IOD <sub>3</sub>	IOD <sub>2</sub>	IOD <sub>1</sub>
	U/cm <sup>2</sup>	nmol/cm <sup>2</sup>	NG x pixel <sup>2</sup> /ng	ng	NG x pixel <sup>2</sup>	NG x pixel <sup>2</sup>	NG x pixel <sup>2</sup>
1	6,00	27,6	71,61	14,76	8331,1	15010	35510
2	8,00	40,0	93,23	11,70	10187,0	22653	45410
3	6,00	112,0	97,31	4,26	11933,0	24148	48114
4	4,00	40,0	64,03	11,73	7132,8	16546	30723
5	6,00	70,0	87,15	66,96	10502,0	21630	42783
6	8,00	100,0	93,51	51,36	11550,0	22339	46485
7	3,17	70,0	50,77	9,59	5432,5	12876	24695
8	8,83	70,0	106,11	10,98	11653,0	24682	50055
9	6,00	70,0	97,52	6,07	11288,0	23556	48347
10	6,00	70,0	92,47	4,62	13458,0	26446	49262
11	6,00	70,0	90,52	9,39	10818,0	22274	44143
12	4,00	100,0	57,85	3,89	6820,8	14420	28650
13	6,00	70,0	97,47	10,43	11947,0	23808	47404

La respuesta UD para los 13 experimentos fue ajustada a un modelo lineal, mientras que las respuestas K, DOI<sub>1</sub>, DOI<sub>2</sub> y DOI<sub>3</sub>, se ajustaron a un modelo cuadrático. Los coeficientes de estos modelos fueron calculados por regresión múltiple manual validada por un análisis de la variancia (ANOVA). Estos modelos fueron los elegidos porque presentaron bajos valores de desviación estándar y adecuados valores de R<sup>2</sup> indicando una buena relación entre los valores obtenidos experimentalmente y los modelos ajustados a pesar de que los métodos utilizados para realizar las mediciones poseen una gran dispersión intrínseca (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Resumen parámetros estadísticos de ajuste a los modelos para UD, K, DOI<sub>1</sub>, DOI<sub>2</sub> y DOI<sub>3</sub>.

	UD	K	DOI <sub>1</sub>	DOI <sub>2</sub>	DOI <sub>3</sub>
<b>desviación estándar</b>	1,95	7,18	3433,56	2504,59	1066,58
<b>(CV%)</b>	(23,19)	(8,49)	(8,24)	(12,04)	(10,58)
<b>R<sup>2</sup></b>	0,741	0,901	0,919	0,816	0,888

En la **Figura 15** pueden visualizarse los modelos de ecuación predichos mediante los gráficos de superficie de respuesta, los cuales son gráficos teóricos tridimensionales mostrando la relación entre una respuesta y las variables independientes. Las respuestas DOI<sub>1</sub>, DOI<sub>2</sub> y DOI<sub>3</sub> presentan valores máximos en las regiones del diseño donde las cantidades de enzima y de sustrato son altas (**Figura 15a-c**). La dependencia de estos tres indicadores con respecto a la concentración de enzima fue muy similar, aunque aparentemente la disminución de la respuesta al disminuir la concentración de sustrato es algo menos marcada a medida que aumenta la concentración de ácido kójico. La superficie observada para la pendiente K fue muy similar a las de DOIs, presentando un valor máximo en la region del diseño donde las cantidades de enzima y de sustrato son altas (**Figura 15d**). Sin embargo el UD presenta su mínimo valor cuando la cantidad de enzima es baja y cantidad de sustrato es alta.



**Figura 15.** Gráficos de superficie de respuesta de: **(a)** IOD1, Densidad Óptica Integrada obtenida para 500 ng/punto de ácido kójico, **(b)** IOD2, Densidad Óptica Integrada obtenida para 250 ng/punto de ácido kójico, **(c)** IOD3, Densidad Óptica Integrada obtenida para 125 ng/punto de ácido kójico, **(d)** K, pendiente de la recta de regresión lineal, **(e)** UD, umbral de detección.

En los casos en los que el análisis incluye a una sola respuesta, el simple análisis de la superficie generada para esta respuesta permite identificar regiones de la superficie de respuesta en las que el proceso evaluado es probable que presente resultados deseables. Sin

embargo, cuando se pretende evaluar más de una respuesta, es necesario introducir una función que represente a todas las respuestas: la deseabilidad. Esta función de deseabilidad debe incluir las prioridades y los indicadores deseados por el analista en la construcción del proceso de optimización. Esta función puede ser uni o bilateral, dependiendo de si cada una de las respuestas tiene que ser maximizada o minimizada, o tiene un valor objetivo asignado. Cuando éste es el caso, el procedimiento involucra la creación de una función de deseabilidad ( $d_i$ ) para cada respuesta individual y posteriormente la creación de una función de deseabilidad global (D) que debe ser maximizada eligiendo las mejores condiciones para las variables del diseño. Esta función D varía entre 0 (Valor totalmente no deseado) y 1 (todas las respuestas están en un rango deseado simultáneamente), y está definida por la ecuación siguiente:

$$D = \{d_1 \times d_2 \times d_3 \times \dots \times d_m\}^{1/m}$$

Donde  $d_1, \dots, d_m$  corresponden a las funciones de deseabilidad individuales ( $d_i$ ) para cada respuesta a ser optimizada.

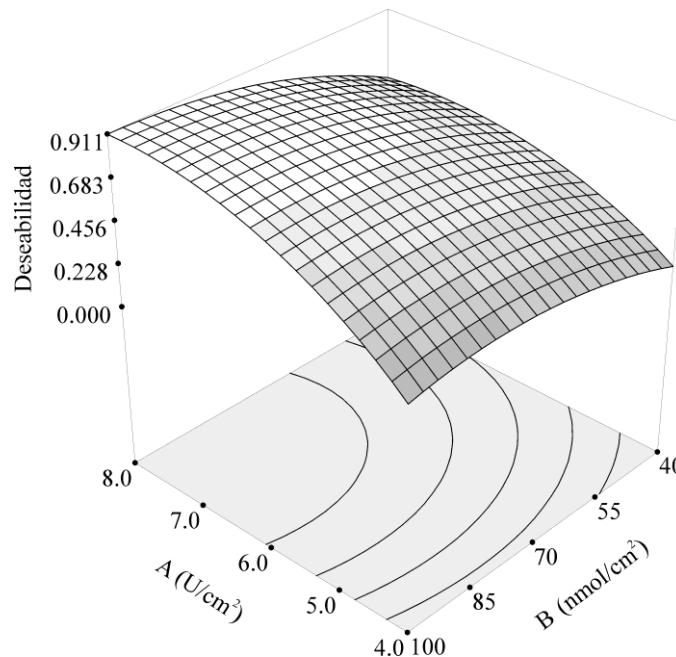
En nuestro caso, las cinco respuestas (UD, K, DOI<sub>1</sub>, DOI<sub>2</sub> Y DOI<sub>3</sub>) fueron optimizadas simultáneamente usando una función de deseabilidad. La **Tabla 5** muestra los criterios que fueron seguidos para la optimización de las respuestas individuales. Como se puede ver, se consideró deseable que todas las respuestas fueran máximas con excepción de la respuesta UD, que se desea que tenga el menor valor posible.

**Tabla 5.** Criterios para la optimización de las respuestas individuales.

Respuesta/Factor	Objetivo	Límite inferior	Límite superior
Cantidad de tirosinasa (U/cm <sup>2</sup> )	dentro del rango	4	8
Cantidad de L-tirosina (nmol/cm <sup>2</sup> )	dentro del rango	40	100
UD (ng)	mínima	3,894	14,758
K (NG x pixel <sup>2</sup> /ng)	máxima	50,765	106,11
DOI <sub>1</sub> ( NG x pixel <sup>2</sup> )	máxima	24695	50055
DOI <sub>2</sub> (NG x pixel <sup>2</sup> )	máxima	12876	26446
DOI <sub>3</sub> (NG x pixel <sup>2</sup> )	máxima	5432,5	13458

Siguiendo las restricciones y las condiciones previamente definidas se llevó a cabo el proceso de optimización y se obtuvo el gráfico para la función de deseabilidad global en función de las dos variables independientes evaluadas. Como se puede observar en la **Figura**

**16**, cuando aumentan la concentración de enzima y de sustrato, la función global de deseabilidad (D) adquiere valores mayores.



**Figura 16.** Gráfico de Superficie de Respuesta correspondiente a la deseabilidad global (D) en función de las variables independientes en estudio.

Las condiciones experimentales correspondientes al máximo en la función de deseabilidad ( $D=0,911$ ) son:  $99,4 \text{ nmol/cm}^2$  de L-tirosina y  $7,76 \text{ U/cm}^2$  de tirosinasa. Los valores para las correspondientes respuestas individuales para el valor anterior de deseabilidad son:  $UM= 5,154 \text{ ng}$ ,  $K=102,172 \text{ NG} \times \text{pixel}^2/\text{ng}$ ,  $DOI_1=50149,8 \text{ NG} \times \text{pixel}^2$ ,  $DOI_2= 24736,18 \text{ NG} \times \text{pixel}^2$  y  $DOI_3=12459,84 \text{ NG} \times \text{pixel}^2$ .

### 3.1.1.7 Verificación experimental

Las condiciones óptimas predichas para el ensayo fueron verificadas por experimentos adicionales independientes, realizando las curvas por triplicado. En estos experimentos se utilizaron las cantidades de enzima y sustrato indicadas por el máximo de la función de deseabilidad ( $99,4 \text{ nmol/cm}^2$  de L-tirosina y  $7,76 \text{ U/cm}^2$  de tirosinasa).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 6**, donde puede observarse que las diferencias encontradas entre valores predichos y los valores experimentales están dentro del rango de la desviación estándar propia del método.

**Tabla 6.** Resumen valores predichos y valores experimentales

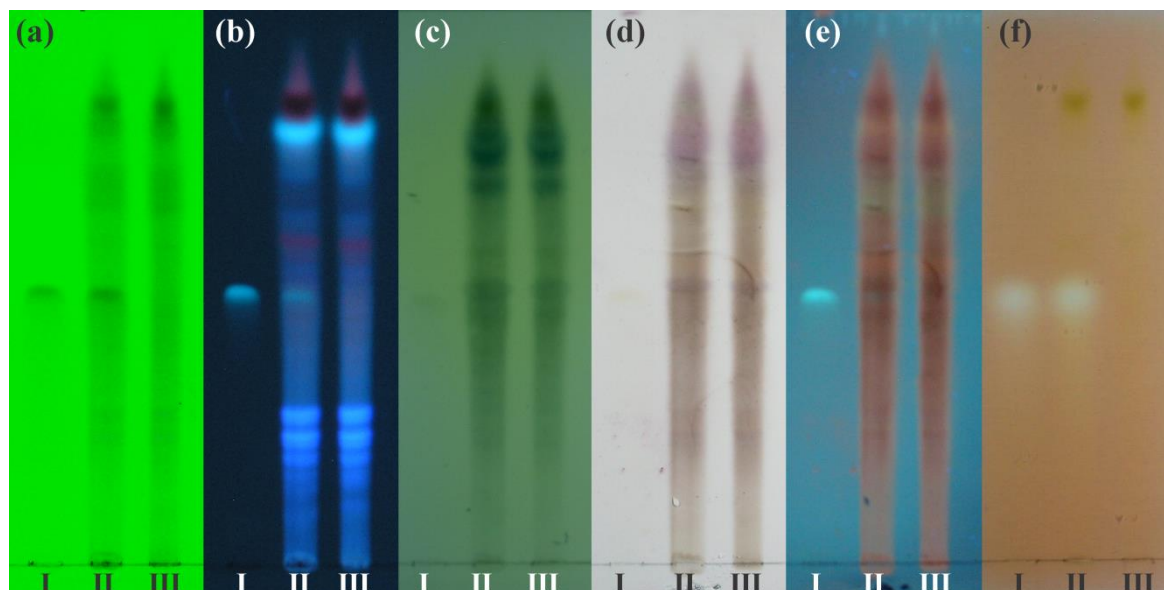
Respuesta	Valor predicho	Valor experimental
UM [ng]	5,15	5,50 ± 0,58
K (NG x <i>pixel</i> <sup>2</sup> /ng)	102,17	102,20 ± 1,02
DOI <sub>1</sub> (NG x <i>pixel</i> <sup>2</sup> )	50149,80	50468,30 ± 390,73
DOI <sub>2</sub> (NG x <i>pixel</i> <sup>2</sup> )	24736,18	24150,01 ± 749,17
DOI <sub>3</sub> (NG x <i>pixel</i> <sup>2</sup> )	12459,84	12733,00 ± 603,39

De lo antes expuesto, se puede concluir que los valores obtenidos experimentalmente son congruentes con los valores predichos por el programa Design-Expert.

### 3.1.1.8 Aplicabilidad del ensayo para detección de inhibidores de tirosinasa en mezclas complejas

Con el fin de probar la aplicabilidad del ensayo para la localización de compuestos activos en una matriz compleja, se investigó la presencia/ausencia de un inhibidor conocido de la enzima, como es el ácido kójico, en una matriz compleja dada por extractos vegetales no inhibidores de la enzima.

Para la evaluación se sembraron 3 calles en una placa cromatográfica. En una calle se sembró ácido kójico, en la segunda calle se sembró una mezcla de ácido kójico y la matriz (0,1 % P/P de ácido kójico) y por último en una tercera calle se sembró solamente la matriz. Como matriz inactiva se utilizó una fracción diclorometánica de un extracto metanólico de *Calamagrostis viridiflavescens* (Poir.) Steud. que mostró por CCD la presencia de una variedad interesante de componentes incluyendo manchas con comportamiento cromatográfico similar al ácido kójico. Esta placa cromatográfica fue desarrollada y posteriormente fue revelada utilizando luz UV, diferentes reveladores químicos y utilizando las condiciones experimentales verificadas en la sección anterior para la autografía con tirosinasa (**Figura 17**).



**Figura 17.** Siembras: 0,1  $\mu\text{g}$  de ácido kójico (I), 100  $\mu\text{g}$  de fracción diclorometánica de *C. viridiflavescens* con 0,1  $\mu\text{g}$  de ácido kójico (II) y 100  $\mu\text{g}$  de fracción diclorometánica de *C. viridiflavescens* (III). **(a)** Detección bajo luz UV<sub>254 nm</sub> **(b)** Detección bajo luz UV<sub>365 nm</sub> **(c)** Revelado con ácido fosfomolibdico **(d)** Revelado con *p*-anisaldehído sulfúrico **(e)** Revelado con *p*-anisaldehído sulfúrico, detección bajo luz UV<sub>365 nm</sub> **(f)** Autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa. La elución de las placas se realizó en AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (74:15:11).

Como se muestra en la calle II de la **Figura 17**, donde se analiza la matriz conteniendo ácido kójico, la presencia del inhibidor es detectada más o menos tenuemente cuando la placa de CCD se analiza bajo luz UV (**Figura 17a y b**, calle II) y no se detecta cuando la placa se revela con diferentes reactivos derivatizantes comunes tales como el ácido fosfomolibdico o *p*-anisaldehído sulfúrico (**Figura 17c-e**, calle II). Cuando se aplica la autografía enzimática, se observa un halo de inhibición a  $R_f = 0,5$  correspondiente al ácido kójico, indicando que las condiciones encontradas son adecuadas para permitir la detección de 0,1 % P/P ácido kójico en una matriz compleja.

### 3.1.2 Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa

Acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima responsable de la terminación de la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis colinérgica catalizando la rápida hidrólisis de la acetilcolina (ACh).<sup>102</sup> La inhibición de AChE sirve como una estrategia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, demencia senil, ataxia, miastenia gravis y enfermedad de Parkinson.<sup>103</sup> La enfermedad de Alzheimer es uno de los trastornos neurodegenerativos más comunes y una causa frecuente de demencia con el envejecimiento.<sup>102</sup>

Una de las consecuencias de la enfermedad Alzheimer es la disminución del número de neuronas colinérgicas, con la resultante pérdida de colina acetiltransferasa, y una consecuente disminución de los niveles del acetilcolina.<sup>104</sup> Por consiguiente, la inhibición de AChE se ha convertido en un blanco para el diseño de drogas. En la actualidad hay unos pocos inhibidores aprobados para el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer: tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina. Para los cuales se han reportado serios efectos adversos y problemas asociados a la biodisponibilidad.<sup>105</sup>

Además de la neurobiología, los ensayos de actividad AChE son aplicables en toxicología, control de calidad, seguridad alimentaria, monitoreo ambiental y agroindustrias, jugando un rol importante en el diagnóstico ante la potencial exposición a agentes nerviosos, pesticidas carbamatos y organofosforados.<sup>106, 107</sup>

Dentro de las autografías más citadas para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa se encuentran la desarrollada por Verpoorte<sup>58, 87</sup> basada en el método de Ellman,<sup>108</sup> y la desarrollada por Hostettmann<sup>60</sup> basada en el método de van Asperen.<sup>109,110</sup> En el método de Ellman se emplea acetil tiocolina como sustrato enzimático, donde la tiocolina generada es revelada por reacción con 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) para dar 5-tio-2-nitrobenzoato (color amarillo). Por su parte el método de van Asperen se basa en la hidrólisis del acetato de 1-naftilo, generando como producto de la reacción enzimática naftol, el cual es revelado mediante una reacción de diazotación con el colorante *Fast Blue B*, para dar un colorante diazo púrpura. Más recientemente se han reportado variantes en las que se cambian las condiciones en las que se aplican estos reactivos<sup>111, 112</sup> o se emplean otros sustratos y sistemas de detección.<sup>113</sup> Recientemente, nuestro grupo ha inmovilizado AChE en gel de agar como parte de desarrollo de una autografía enzimática que puede ser acoplada a

espectrometría de masa de alta resolución para la asignación de fórmulas moleculares a compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa presentes en una mezcla.<sup>61</sup>

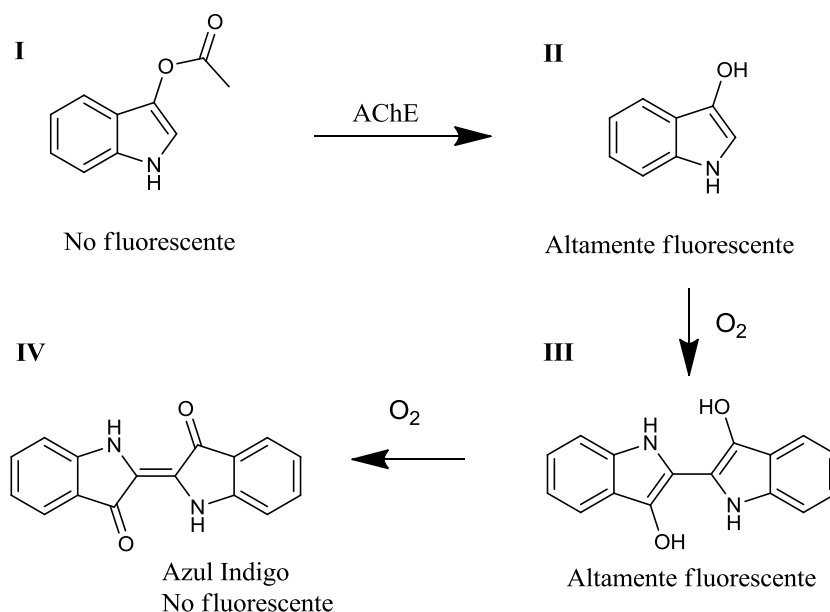
Cada uno de los métodos reportados tiene sus propias desventajas, tales como falta de reproducibilidad de color, baja definición de halos o presencia de falsos negativos o positivos. Por ejemplo, los ensayos basados en la diazotación dan resultados positivos falsos en presencia de fenoles, aminas, cumarinas, cannabinoles y flavonoles<sup>114</sup> mientras que los ensayos basados en el método de Ellman dan resultados positivos falsos en presencia de aldehídos y aminas.<sup>58</sup> El desarrollo de ensayos para detectar estos falsos positivos ha resuelto en parte este problema, sin embargo, son necesarios nuevos ensayos autográficos basados en otros sistemas sustrato/cromógeno complementarios a los ensayos existentes. Un reactivo potencialmente interesante es el acetato de indoxilo que no interactúa con tioles y se presenta como una alternativa interesante al reactivo de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)).<sup>115</sup>

Una limitación común a todos los ensayos autográficos reportados es su falta de compatibilidad con la CCD en fase reversa (FR). Siendo complementaria a la cromatografía en fase normal, la cromatografía en fase reversa es una herramienta clave para la purificación de pequeñas moléculas a partir de mezclas complejas. Sin embargo, la hidrofobicidad de su superficie impide la deposición de una capa acuosa homogénea conteniendo la enzima y los reactivos requeridos para el ensayo. Además, la repulsión hidrofóbica-hidrofílica en la interface hace ineficiente la difusión de compuestos.

Por estos motivos, en esta tesis se desarrolló un nuevo ensayo autográfico para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa sobre CCD en fase reversa utilizando un copolímero anfifílico para inmovilizar la enzima. Además se utilizó un nuevo sistema sustrato/cromógeno que permite tanto la detección tanto bajo luz visible como luz UV<sub>365nm</sub>.

### 3.1.2.1 Sustrato fluorogénico

La enzima AChE cataliza la hidrólisis de acetato de indoxilo (AI, I) no fluorescente, para formar 3-hidroxiindol (II) e índigo blanco (III), ambos fluorescentes, y luego azul de índigo (IV)<sup>116</sup> (**Figura 18**). A medida que la reacción enzimática procede, la fluorescencia decrece y la absorbancia aumenta. En principio esto hace posible el diseño de ensayos que puedan ser monitoreados midiendo los productos fluorescentes y/o los productos coloreados.



**Figura 18.** Reacción de AChE con AI (I) y la consecuente formación de productos fluorescentes (II y III) y coloreados (IV).

El acetato de indoxilo presenta una alta estabilidad a la hidrólisis espontánea, y una diferencia entre el  $\lambda_{\text{exc}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  suficientemente grande como para permitir la visualización de los productos formados sin interferencia del sustrato.<sup>107</sup> Este reactivo ha sido utilizado para el desarrollo de tiras reactivas que utilizan colinesterasa para la detección de organofosforados y carbamatos pesticidas.<sup>117</sup>

### 3.1.2.2 Selección de condiciones para la reacción enzimática sobre la placa cromatográfica

Como se expuso anteriormente, los poloxámeros son copolímeros compuestos de una cadena central hidrofóbica (polipropilenglicol) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas (polietilenglicol). La presencia de estos bloques les da la habilidad de formar micelas. Además, las soluciones de poloxámero tienen comportamiento de gelificación termoreversible,<sup>118</sup> son soluciones a 24 °C y geles a 37,2 °C.<sup>119</sup>

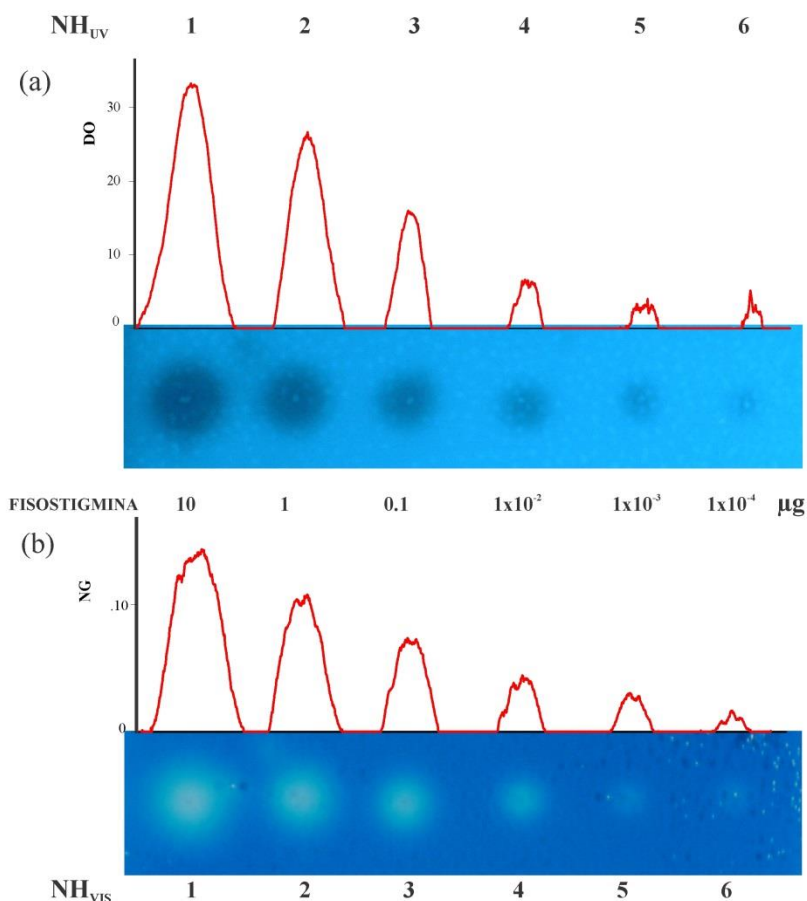
Para verificar la funcionalidad de la AChE inmovilizada en este medio, se realizó la reacción en tubo de ensayo en ausencia y presencia de poloxámero 407 observando a simple vista la fluorescencia bajo luz UV<sub>365nm</sub> y posteriormente la aparición del color azul de forma homogénea. Esto demuestra que el gel no afecta la formación de los productos fluorescentes (**Figura 18**, II y III) ni del subsecuente azul índigo (**Figura 18**, IV). Además, su presencia

evita la precipitación de los productos formados, probablemente debido a un aumento de la viscosidad del medio que favorece una distribución homogénea del color.

Posteriormente, la enzima y el sustrato fueron solubilizados en una solución de poloxámero y distribuidos sobre una CCD de fase reversa. Nuevamente se observó, ahora sobre la placa cromatográfica, la formación inicial de los productos fluorescentes (bajo luz  $UV_{365nm}$ ) y posteriormente el color azul. A medida que la reacción enzimática procede, la fluorescencia disminuye mientras que la absorbancia aumenta. Esta característica haría posible una lectura dual de la autografía enzimática, bajo luz visible y luz  $UV_{365nm}$ , facilitando la detección de inhibidores y disminuyendo las interferencias de la matriz en el caso de muestras complejas.

### 3.1.2.3 Definición de las respuestas experimentales

Con el objetivo de estimar la sensibilidad del ensayo y su límite de detección, se definieron 4 indicadores de respuesta:  $DOI_{UV}$ ,  $DOI_{VIS}$ ,  $NH_{UV}$  y  $NH_{VIS}$ .  $DOI$  se definió como la densidad óptica integrada obtenida para 10  $\mu g$  de fisostigmina.  $NH$  se estableció como el N° de halos detectados en CCD sembradas con cantidades decrecientes de fisostigmina. El subíndice  $UV$  y  $Vis$  indican observación bajo luz  $UV_{365nm}$  y luz visible, respectivamente (**Figura 19**). Con este fin, se llevó a cabo un diseño experimental utilizando Design-Expert 7.0.3 y la medición de las señales de los halos utilizando el programa Gel-Pro Analyzer 3.0.



**Figura 19.** CCD sembrada con cantidades decrecientes de fisostigmina y reveladas con el ensayo de AChE. **(a)** DO, Densidad Óptica de los halos obtenida por el programa Gel- Pro Analyzer bajo luz UV<sub>365 nm</sub> y **(b)** NG, Nivel de Gris de los halos obtenido por el software Gel- Pro Analyzer bajo luz visible.

### 3.1.2.4 Fase de *screening* de factores significativos

Con el objeto de establecer qué factores tienen efectos estadísticamente significativos en las respuestas a evaluar se construyó un diseño de Placket–Burman. Los factores analizados fueron: cantidad de acetato de indoxilo (CAI), cantidad de AChE (CAChE), pH, tiempo de incubación ( $t_{inc}$ ) y temperatura de incubación ( $T_{inc}$ ). Cada uno de estos factores se evaluó a dos niveles (**Tabla 7**). El rango en el cual se evaluaron los factores se decidió en función del conocimiento previo del sistema en estudio. La concentración de enzima se evaluó entre 0,25 U/mL y 2 U/mL, esto es entre la mitad de la mínima concentración de enzima utilizada en ensayos autográficos de AChE<sup>112</sup> y 4 veces esa mínima concentración. El  $t_{inc}$  se evaluó entre 15 minutos (el mínimo tiempo reportado)<sup>87</sup> y 60 minutos. El pH se evaluó en el rango usado en el ensayo en tubo de AChE que utiliza acetato de indoxilo como sustrato<sup>116</sup> y también teniendo en cuenta que la actividad de AchE disminuye alrededor del 50 % cuando el pH es menor que 6 o mayor que 8.<sup>120</sup> El efecto de la temperatura fue evaluado

teniendo en cuenta que la actividad de AchE disminuye entre el 40 y el 50 % a temperaturas menores a 25 °C y superiores a 40 °C.<sup>120</sup> La concentración de AI se evaluó entre 1 y 5 mM, empezando por la cantidad más baja usualmente empleada en ensayos autográficos de AChE.<sup>87</sup>

**Tabla 7.** Diseño Plackett–Burman construido para la selección de los factores significativos. **(a)** CAI: Concentración de acetato de indoxilo; CACHe: concentración de acetilcolinesterasa;  $T_{inc}$ : Temperatura de incubación;  $t_{inc}$ : tiempo de incubación. **(b)**  $NH_{VIS}$  y  $NH_{UV}$ : número de halos detectados bajo luz visible y  $UV_{365nm}$ , respectivamente;  $DOI_{VIS}$  y  $DOI_{UV}$ : densidad óptica integrada (DOI) para 10  $\mu g$  de fístigmina bajo luz visible y  $UV_{365nm}$ , respectivamente.

Experimento	Factores <sup>a</sup>				Respuestas <sup>b</sup>				
	CAI mM	CACHe [U/mL]	$T_{inc}$ [°C]	$t_{inc}$ [minutos]	pH	$NH_{VIS}$	$NH_{UV}$	$DOI_{VIS}$ [GL×pixel <sup>2</sup> ]	$DOI_{UV}$ [OD×pixel <sup>2</sup> ]
1	1,00	0,25	25,00	60,00	6,00	0	1	0	273,61
2	1,00	0,25	40,00	15,00	8,00	0	1	0	144,61
3	1,00	2,00	25,00	60,00	8,00	3	3	236000	2699,30
4	5,00	2,00	40,00	15,00	6,00	0	1	0	133,90
5	5,00	2,00	25,00	60,00	8,00	6	3	525000	2574,00
6	1,00	2,00	40,00	15,00	8,00	3	4	54928	605,54
7	5,00	0,25	25,00	15,00	8,00	0	0	0	0
8	1,00	0,25	25,00	15,00	6,00	0	1	0	108,99
9	5,00	0,25	40,00	60,00	8,00	0	0	0	0
10	5,00	2,00	25,00	15,00	6,00	0	3	0	135,25
11	5,00	0,25	40,00	60,00	6,00	0	0	0	0
12	1,00	2,00	40,00	60,00	6,00	6	6	161000	3130,30

De la prueba ANOVA aplicada a los valores obtenidos experimentalmente, se encontraron 3 factores significativos ( $p < 0,05$ ): CAI, CACHeA, y  $t_{inc}$ . ( $p < 0,05$ ), por lo que deben ser considerados en la etapa posterior de optimización. Al contrario,  $T_{inc}$  y pH no afectaron significativamente las respuestas ( $p > 0,05$ ). Por lo cual para las siguientes etapas,  $T_{inc}$  y pH se fijaron en 37 °C y 6,0, respectivamente.

### 3.1.2.5 Fase de optimización

Una vez identificados los factores más significativos, se llevó a cabo la optimización usando el método de superficie de respuesta para estimar sus valores, considerando el mejor compromiso entre el máximo  $DOI_{UV}$ ,  $DOI_{VIS}$ ,  $NH_{UV}$  y  $NH_{VIS}$ . Se empleó un diseño central

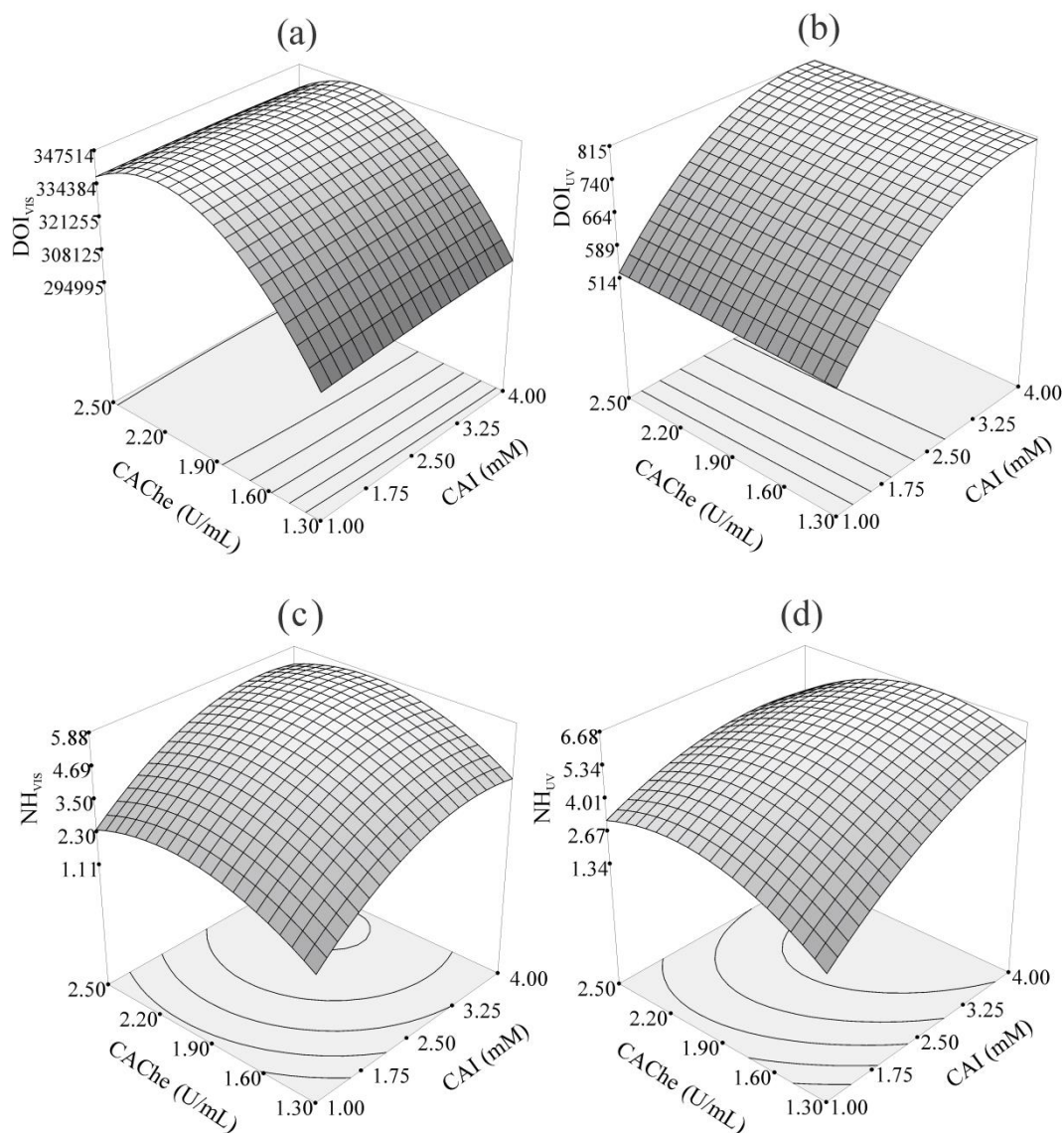
compuesto de 20 experimentos ( $2^6 = 8$  puntos de dos factores a dos niveles,  $2 \times 3 = 6$  puntos axiales y un punto central por sextuplicado). Los factores se combinaron en los rangos: CAI 1-4 mM, CACHe 1,3-2,5 U/mL y  $t_{inc}$  30-60 minutos (**Tabla 8**), ( $T_{inc}$  y pH fijados en  $37^\circ\text{C}$  y 6,0, respectivamente), **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Diseño central compuesto usado para la optimización de las respuestas evaluadas. (a) CAI: Concentración de acetate de indoxilo; CACHe: concentración de acetilcolinesterasa;  $t_{inc}$ : tiempo de incubación. (b)  $NH_{VIS}$  y  $NH_{UV}$ : número de halos detectados bajo luz visible y  $UV_{365nm}$ , respectivamente;  $DOI_{VIS}$  y  $DOI_{UV}$ : densidad óptica integrada (DOI) para 10  $\mu\text{g}$  de fisostigmina bajo luz visible y  $UV_{365nm}$ , respectivamente.

Experimento	Factores <sup>a</sup>			Respuestas <sup>b</sup>			
	CAI	CACHe	$t_{inc}$	$NH_{VIS}$	$NH_{UV}$	$DOI_{VIS}$	$DOI_{UV}$
	mM	U/mL	minutos			NG x pixel <sup>2</sup>	DO x pixel <sup>2</sup>
1	2,50	1,90	45,00	5	6	342210	754
2	4,00	2,50	30,00	4	5	337530	812
3	4,00	1,30	60,00	4	6	299730	808
4	2,50	1,30	45,00	4	5	296500	749
5	1,00	2,50	30,00	1	4	337220	525
6	1,00	2,50	60,00	3	3	337410	527
7	2,50	1,90	45,00	5	6	342320	755
8	2,50	1,90	60,00	5	6	343340	751
9	2,50	1,90	45,00	5	6	342400	753
10	4,00	2,50	60,00	5	5	337640	815
11	2,50	1,90	45,00	5	6	342134	753
12	2,50	2,50	45,00	4	5	337620	751
13	4,00	1,30	30,00	3	5	298710	807
14	2,50	1,90	45,00	5	6	342130	751
15	1,00	1,30	30,00	1	1	294090	510
16	1,00	1,30	60,00	1	1	295010	514
17	2,50	1,90	30,00	5	6	342320	750
18	1,00	1,90	45,00	2	5	340310	520
19	4,00	1,90	45,00	6	6	343010	810

El primer paso que se llevó a cabo para la optimización fue encontrar una aproximación adecuada a la verdadera relación entre los factores y cada una de las respuestas. Entonces, las respuestas de los 20 experimentos se ajustaron a modelos polinómicos, usando la función “*backward elimination*” del programa Design-Expert para estimar los mejores modelos. Las formas más comunes de ajuste son los polinomios de bajo orden (primer o

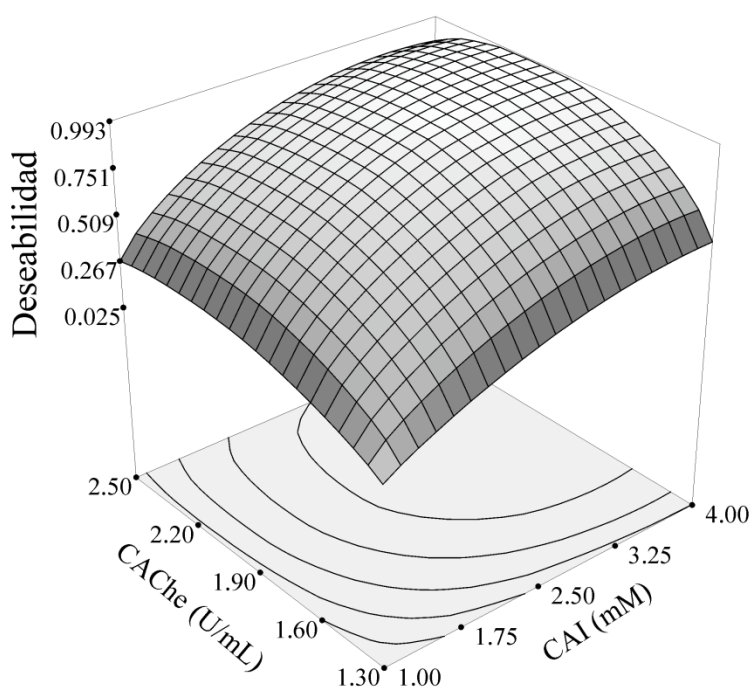
segundo orden). La construcción de modelos de superficie para cada respuesta fue un proceso iterativo. Una vez que se obtuvo un modelo aproximado, la bondad de ajuste se evaluó para determinar si la solución fue satisfactoria. Los resultados indicaron que los modelos cuadráticos explican adecuadamente el comportamiento de las respuestas  $NH_{VIS}$ ,  $NH_{UV}$ ,  $DOI_{VIS}$ , y  $DOI_{UV}$  (**Figura 20**). Para este diseño de optimización, ANOVA parcial mostró buenos indicadores de ajuste es decir, un modelo significativo ( $p < 0,05$ ), una falta de ajuste no significativa ( $p > 0,05$ ), valores de precisión adecuados mayores a 4 y los  $R^2$  mayores a 0,90.



**Figura 20.** Gráficos de superficie de respuesta para densidad óptica integrada (DOI) para 10  $\mu\text{g}$  de fisostigmina bajo: **(a)** luz visible ( $DOI_{VIS}$ ) y **(b)** luz UV<sub>365nm</sub> ( $DOI_{UV}$ ); número de halos detectados bajo: **(c)** luz visible ( $NH_{VIS}$ ) y **(d)** luz UV<sub>365nm</sub> ( $NH_{UV}$ ).

De acuerdo a las superficies obtenidas,  $DOI_{vis}$  es más sensible a cambios en concentración de enzima que a cambios en la concentración de sustrato (**Figura 20a**) mientras que  $DOI_{uv}$  es más sensible a cambios en la concentración de sustrato que a la concentración de enzima (**Figura 20b**). En cuanto a los números de halos detectados,  $NH_{vis}$  tiende a aumentar cuando aumenta la concentración de sustrato a cualquiera de las concentraciones de enzima probadas, sin embargo,  $NH_{uv}$  aumenta con la concentración de sustrato solamente a concentraciones de enzima inferiores a 1,90 U/mL (**Figura 20c y d**).

Para optimizar simultáneamente  $NH_{vis}$ ,  $NH_{uv}$ ,  $DOI_{vis}$  y  $DOI_{uv}$ , se modeló una función de deseabilidad  $D$ , como se describió en la **Sección 3.1.1.6**. Las 4 respuestas se optimizaron simultáneamente basadas en las 3 variables independientes, CAI, CACHe y  $t_{inc}$ . Se obtuvo una superficie para la función  $D$  en función de los factores influyentes CAI y CACHe, manteniendo  $t_{inc}=60$  min (**Figura 21**). Las condiciones teóricas para un máximo de la función deseabilidad ( $D=0,993$ ) fueron: 3,63mM AI, 2,09 U/mL CACHe y 60 minutos para  $t_{inc}$  ( $T_{inc}=37$  °C y pH=6,00).



**Figura 21.** Gráfico de superficie de respuesta para función de deseabilidad global.

### 3.1.2.6 Verificación experimental

Las condiciones óptimas predichas para el ensayo fueron verificadas por experimentos adicionales independientes. Estos se realizaron en las condiciones indicadas por el máximo de la función de deseabilidad (3,63 mM AI, 2,09 U/mL AChEA,  $T_{inc}=37$  °C,  $t_{inc}=60$  minutos y pH=6,00).

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**, donde puede observarse que las diferencias encontradas entre los valores predichos y los valores experimentales están dentro del rango de la desviación estándar propia del método.

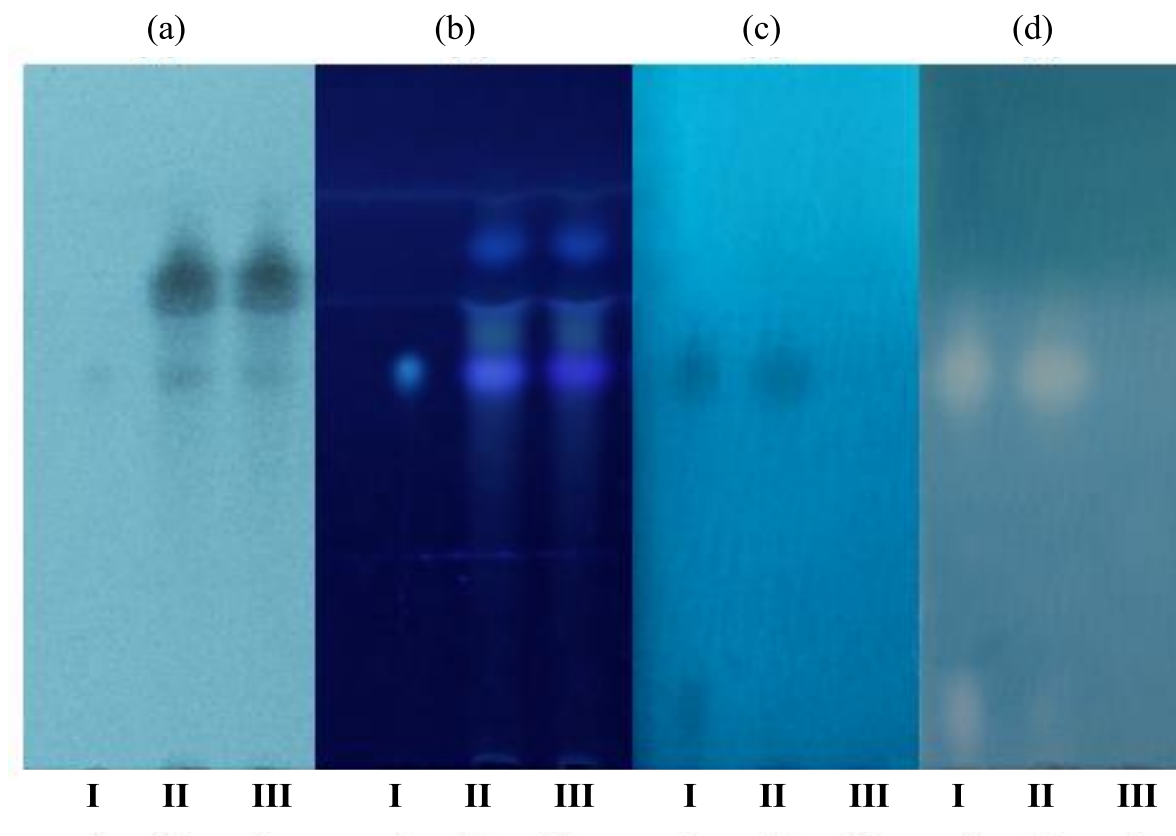
**Tabla 9.** Resumen valores predichos y valores experimentales.

Respuestas	Valor predicho	Valor experimental
NS <sub>VIS</sub>	5,87	6
NS <sub>UV</sub>	6,31	6
DOI <sub>VIS</sub> (NG x <i>pixel</i> <sup>2</sup> )	347395,00	343551,67 ± 290,75
DOI <sub>UV</sub> (DO x <i>pixel</i> <sup>2</sup> )	814,11	810,65 ± 3,57

De lo antes expuesto, se puede concluir que los valores obtenidos experimentalmente son consistentes con los valores predichos por el programa Design-expert.

### 3.1.2.7 Aplicabilidad para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa en mezclas complejas en CCD-FR

Para probar la aplicabilidad del ensayo se investigó la presencia/ausencia de fisostigmina en presencia de una matriz compleja. En este estudio se utilizó como matriz compleja inactiva el aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore. Esta mezcla natural muestra por CCD la presencia de una variedad de componentes incluyendo algunos con comportamiento cromatográfico similar a la fisostigmina. El aceite esencial de *P. racemosa*, el aceite esencial de *P. racemosa* cosechado con fisostigmina (en una relación 0,01 % P/P) y fisostigmina pura fueron cromatografiados en fase reversa (MeOH, 0,01% V/V TEA) en paralelo (**Figura 22**). Una vez desarrollada la CCD, la fase móvil fue removida bajo una corriente de aire a temperatura ambiente y la placa fue revelada con el ensayo autográfico desarrollado en las condiciones halladas como óptimas en la etapa de optimización.

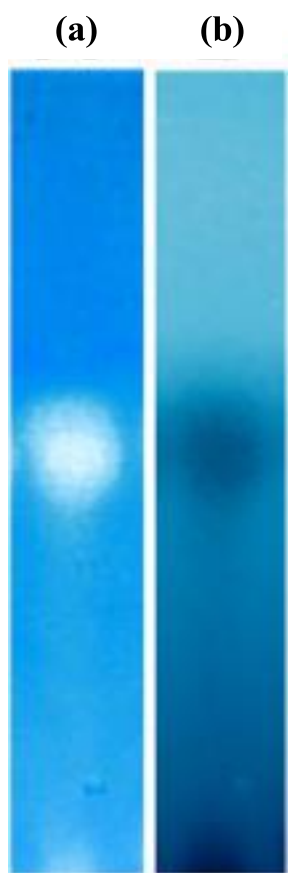


**Figura 22.** Autografía para la detección de inhibidores de AChE en CCD-FR. De izquierda a derecha, fisostigmina 0,025 µg (I), 250 µg de aceite esencial de hojas de *Pimenta racemosa* conteniendo con 0,01 % P/P de fisostigmina (II) y 250 µg de aceite esencial de hojas de *Pimenta racemosa* (III): **(a)** Detección bajo luz UV<sub>254nm</sub>; **(b)** Detección bajo luz UV<sub>365nm</sub>; **(c)** autografía AChE visualizada bajo luz UV<sub>365nm</sub>; **(d)** autografía AChE visualizada bajo luz visible. La elución de las placas se realizó en metanol conteniendo 0,01% de trietilamina.

Como puede observarse en la **Figura 22**, la presencia de fisostigmina pasa desapercibida en el extracto consembrado cuando se observa la placa bajo luz UV<sub>365nm</sub> o UV<sub>254nm</sub> (**Figura 22a** y **b**, calle II). Cuando la autografía es aplicada, un halo de inhibición correspondiente a fisostigmina es observado claramente a  $R_f = 0,53$ , indicando que las condiciones encontradas permiten la detección de 0,1 % P/P de la misma en una mezcla compleja (**Figura 22c** y **d**). Es interesante notar que los otros componentes del aceite esencial no generan falsos positivos, interferencia con el color de la reacción o extinción de la fluorescencia.

El ensayo autográfico también se aplicó al aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (lemongrass). Este aceite esencial es utilizado para demostrar la aplicación del ensayo ya que previamente se ha reportado su actividad inhibitoria de la enzima AChE,<sup>121, 122</sup>

utilizando las condiciones cromatográficas indicadas para el caso anterior. En la **Figura 23** puede observarse claramente una zona de inhibición a  $R_f=0,5$ .

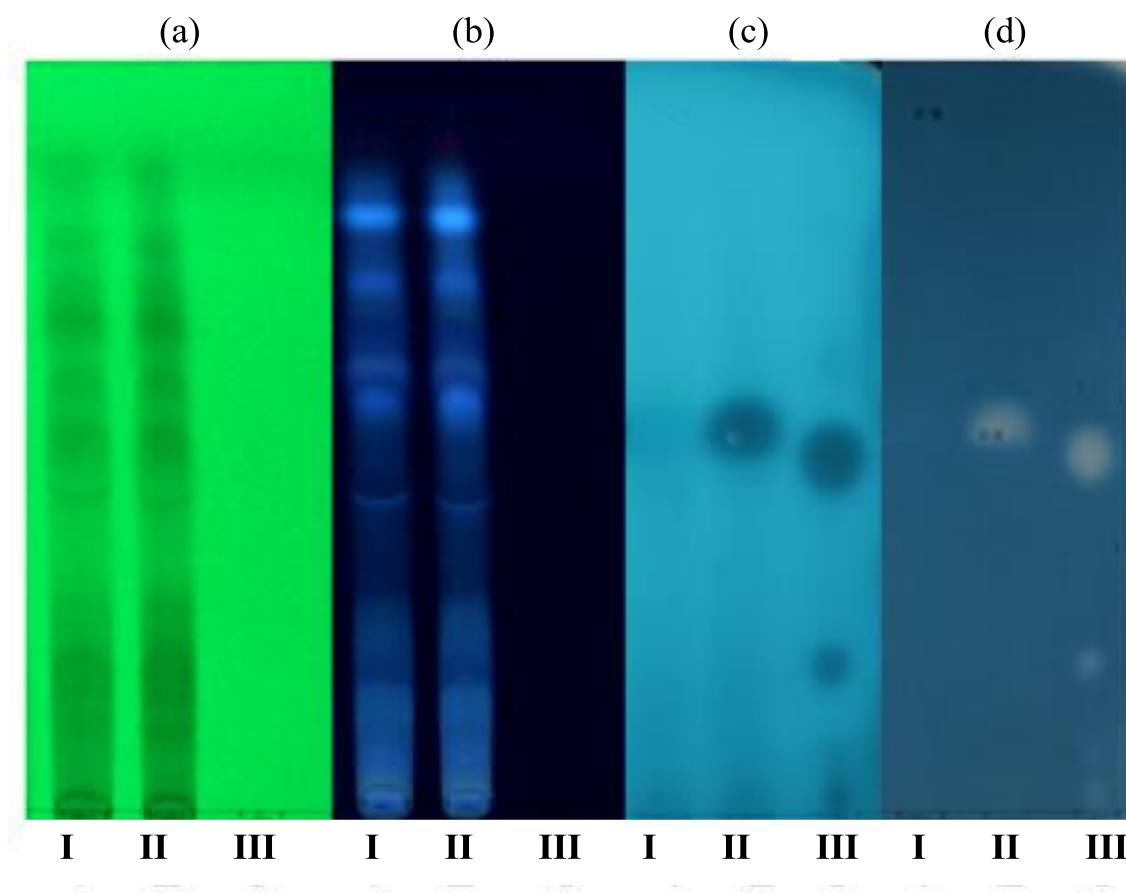


**Figura 23.** Autografía para la detección de inhibidores de AChE en CCD- FR de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*. Visualización: (a) bajo luz visible y (b) bajo luz UV<sub>365nm</sub>. La elución se llevó a cabo usando MeOH como fase móvil conteniendo 0,01% de trietilamina.

### 3.1.2.8 Aplicabilidad para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa en mezclas complejas en CCD en fase normal

La aplicabilidad del ensayo empleando Silica gel como soporte de fase normal, se probó usando un extracto de *Sonchus oleraceus* L. como matriz compleja. Al igual que en el caso anterior, se utilizó este extracto como matriz debido a que por análisis en CCD, el mismo muestra una variedad de componentes incluyendo manchas con comportamiento cromatográfico similar a la fisostigmina. El extracto de *S. oleraceus* (**Figura 24**, calle I), *S. oleraceus* cosechado con fisostigmina en una relación 0,01 % P/P. (**Figura 24**, calle II), y fisostigmina pura (**Figura 24**, calle III) se separaron por CCD. Luego se reveló con la

solución de poloxámero 407 conteniendo AChE y acetato de indoxilo en las cantidades optimizadas. La autografía exhibió el halo de fisostigmina en  $R_f=0,47$  (DCM:MeOH (60:40)).



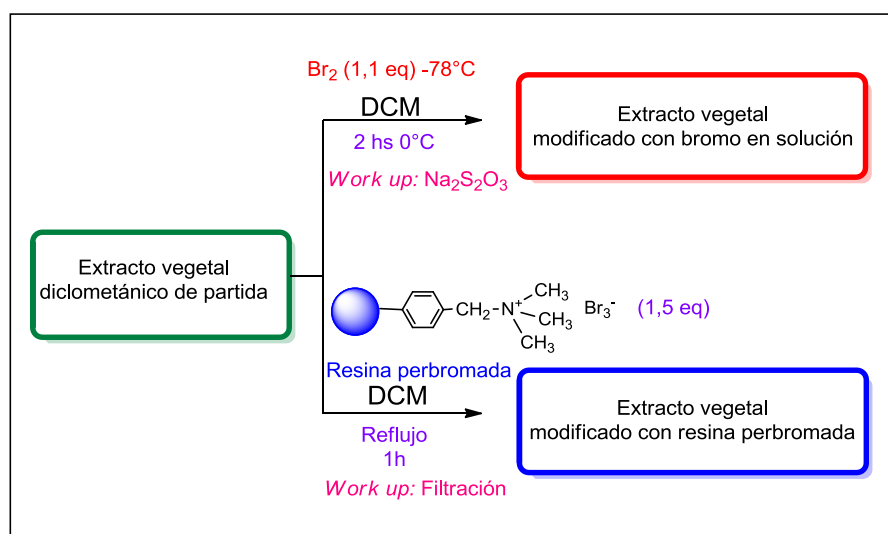
**Figura 24.** Autografía para la detección de inhibidores de AChE en CCD-FN. De izquierda a derecha, fisostigmina 0,025  $\mu\text{g}$  (I), 250  $\mu\text{g}$  de extracto de *Sonchus oleraceus* conteniendo 0,01 % P/P de fisostigmina (II) y 250  $\mu\text{g}$  de extracto de *Sonchus oleraceus* (III): **(a)** Detección bajo luz UV<sub>254nm</sub>; **(b)** Detección bajo luz UV<sub>365nm</sub>; **(c)** autografía de AChE visualizada bajo luz UV<sub>365nm</sub>; **(d)** autografía de AChE visualizada bajo luz visible. La elución de las placas se realizó DCM:MeOH (60:40)

Estos resultados muestran que el ensayo es también compatible con CCD en fase normal, presentando la ventaja de poder visualizar la actividad enzimática de forma dual tanto bajo luz visible como luz UV<sub>365nm</sub>. El ensayo puede detectar cantidades de fisostigmina inferiores a  $1 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ , siendo más sensible que algunos de los métodos autográficos reportados para placas de sílica gel que utilizan otros sustratos (límite de detección reportado  $1 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ).<sup>60, 87</sup> Sin embargo, la sensibilidad observada sigue siendo menor que la del método reportado por Yang y col.<sup>112</sup>

### 3.2 Reacción de bromación

Se utilizaron dos protocolos diferentes para la modificación de extractos por bromación como se muestra en la **Figura 25**. En una primera instancia estas reacciones de modificación se realizaron utilizando directamente bromo como reactivo en DCM con agitación a  $-78^{\circ}\text{C}$ . El exceso de bromo fue eliminado del medio de reacción reduciéndolo a bromuro con tiosulfato de sodio y extrayendo el bromuro de la fase diclorometánica por lavado con agua. Esta reacción fue puesta a punto en nuestro laboratorio y ha llevado recientemente al aislamiento de un inhibidor de acetilcolinesterasa.<sup>15</sup>

En el segundo protocolo de bromación de extractos se utilizó como reactivo la resina comercial Amberlyst A-26<sup>®</sup> en su forma perbromuro, el mismo también fue puesto a punto previamente en nuestro laboratorio. Este reactivo es capaz de bromar posiciones adyacentes a grupos carbonilo de cetonas y aldehídos,<sup>123</sup> además de los grupos funcionales antes mencionados. El procedimiento general consiste en suspender la resina en el extracto vegetal diclorometánico a modificar, mantener a reflujo durante una hora y luego de transcurrido este tiempo filtrar para separar el exceso de reactivo del medio de reacción.



**Figura 25.** Esquema procedimientos de modificación de extractos vegetales mediante reacciones de bromación.

### 3.2.1 *Modificación de extractos con bromo en solución y resina perbromada*

Siguiendo el protocolo de reacción descrito anteriormente, durante la puesta a punto de las condiciones de reacción con bromo en solución se modificaron siete extractos de las siguientes especies: *Anagallis arvensis* L., *Baccharis spicata* (Lam.) Baill., *Baccharis ulicina* Hook. & Arn., *Calamagrostis viridiflavescens* (Poir.) Stend, *Geranium dissectum* L., *Medicago lupulina* L. y *Paspalum dilatatum* Poir. Además, los mismos extractos fueron tratados con resina perbromada para obtener sus correspondientes extractos modificados.

#### 3.2.1.1 **Generación de extractos testigos**

Con el fin de asegurar que los cambios observados en los extractos sean resultantes de la reacción entre los componentes del extracto de partida y el bromo, se generaron extractos testigos. Esto es necesario debido a que las operaciones experimentales a las que los extractos son sometidos (filtración, lavados, contacto con resina de intercambio) para obtener los extractos modificados, podrían llevar a la concentración o dilución de algunos metabolitos presentes en el extracto natural de partida. En el caso de producirse estos cambios en la composición de los extractos, no debidos a la reacción de interés, podrían atribuirse erróneamente a la misma. En líneas generales, los extractos testigos fueron obtenidos sometiendo los extractos de partida a las mismas condiciones en que fueron llevadas a cabo ambas reacciones, sin el agregado del correspondiente agente bromante (**Figura 25**). En el caso del testigo para la reacción con resina perbromada, se utilizó la resina Amberlyst A-26<sup>®</sup> Br<sup>-</sup> (resina de intercambio aniónico) que es el producto en el que se convierte la resina perbromada al bromar a un compuesto.

#### 3.2.1.2 **Rendimiento de extractos modificados y testigos**

Al desconocerse la composición química cuali y cuantitativa de los extractos de partida y de los modificados, los rendimientos de estas reacciones de modificación no pueden calcularse de la manera en que normalmente se hace para reacciones químicas a partir de sustratos puros. De todas formas, aunque se conocieran con exactitud las composiciones químicas de los extractos de partida, los cálculos de los rendimientos serían engorrosos por la gran cantidad de compuestos presentes en la mezclas. Por lo tanto los rendimientos se calcularon como simples proporciones de masa recuperada relativa a la masa de partida según la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa Recuperada}}{\text{Masa de Partida}} \times 100$$

Como puede observarse en la **Tabla 10**, los porcentajes de recuperación de los extractos modificados mediante ambas reacciones son mayores al 100%, a excepción del caso del extracto modificado con bromo en solución a partir de *P. dilatatum*. Estos rendimientos serían inaceptables si se parte del concepto clásico de rendimiento químico, pero como fue definido podrían interpretarse como un aumento en el peso molecular promedio de los constituyentes de los extractos de partida, atribuible posiblemente a la incorporación de bromo en sus estructuras.

**Tabla 10.** Masas recuperadas de extractos relativas a las masas de los extractos de partida.

Extracto de Partida	% Rendimiento Resina perbromada		% Rendimiento Bromo en solución	
	Testigo	Reacción	Testigo	Reacción
<i>Anagallis arvensis</i>	82,20	112,95	80,18	115,36
<i>Baccharis spicata</i>	95,50	150,04	92,13	132,30
<i>Baccharis ulicina</i>	65,23	118,16	76,75	109,70
<i>Calamagrostis viridiflavescens</i>	90,12	126,75	81,64	156,36
<i>Geranium dissectum</i>	92,15	133,45	89,25	129,22
<i>Medicago lupulina</i>	90,31	137,95	85,34	145,50
<i>Paspalum dilatatum</i>	70,15	110,90	80,14	85,60

Además puede observarse que los porcentajes de recuperación obtenidos para los testigos de ambas reacciones son similares, las diferencias en ningún caso superan el 20 % entre dos testigos provenientes del mismo extracto.

### 3.2.2 *Análisis de cambios en la composición química de extractos modificados con bromo*

Para el análisis de cambios en la composición química de los extractos debidos a la reacción de bromación se utilizaron diferentes técnicas analíticas cromatográficas y espectroscópicas, incluyendo el acoplamiento de las mismas a métodos de análisis multivariado como el ACP.

Con el fin de aumentar el número de muestras, se adicionaron a los siete extractos bromados preparados y a sus respectivos testigos, otros ocho extractos bromados con sus

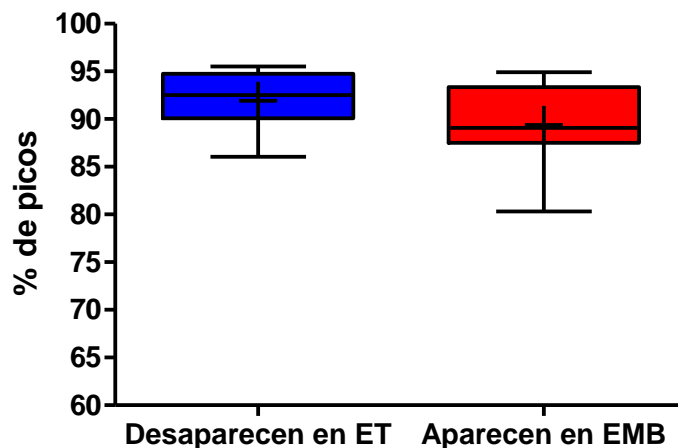
testigos provenientes de la extractoteca del grupo. Los mismos fueron preparados por la Dra. Luciana Mendez. Los extractos adicionados (modificados por ambas reacciones de bromación) fueron los siguientes: *Conium maculatum* L (CM), *Morrenia brachystephana* (Griseb.) (MB), *Rapistrum rugosum* (L.) All (RR), *Sida rhombifolia* L (SR), *Commelina erecta* L. (CE), *Brassica rapa* L. (BR), *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb. (SB) y *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen var. *Parviflora*. (SP)

### 3.2.2.1 Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados con bromo mediante CLAE-EM

Para realizar este análisis, se desarrollaron los cromatogramas en idénticas condiciones para los 15 extractos modificados con resina, los 15 extractos modificados con bromo en solución y para sus respectivos extractos testigos. Previo al análisis de los mismos se les realizó un pre-tratamiento de datos que incluye medidas tales como la detección y el alineado de picos. El objetivo de la detección de picos es separar la señal resultante de un compuesto presente en la muestra de la señal de fondo procedente de interferencia química o instrumental. La operación involucra la identificación de forma correcta de las señales producidas por componentes de la mezcla y la estimación de su intensidad. Luego, la alineación asocia el pico de un compuesto particular a través de todas las muestras del conjunto de datos a analizar.<sup>44,124</sup>

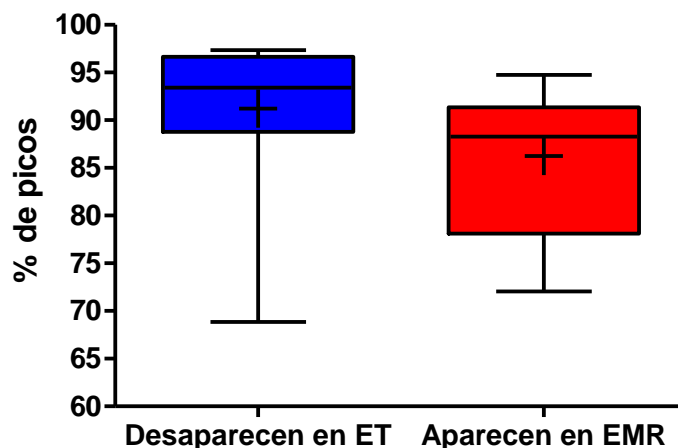
Una vez finalizada la alineación del cromatograma de cada muestra modificada con el de su respectivo testigo, mediante el algoritmo Ransac (*RANdom SAmples Consensus*),<sup>124</sup> se determinó para cada par de extractos testigo/modificado cuáles eran los picos alineados, es decir que estaban presentes en ambos cromatogramas (picos que no han sido alterados por la reacción). De la misma forma se discriminaron los picos presentes exclusivamente en los extractos testigos (picos que desaparecen debido a la reacción de bromación) y en los extractos modificados (picos que aparecen debido a la reacción de bromación).

En el caso de la reacción de bromación en solución, puede observarse que al menos un 85% de los picos presentes en los extractos testigo (ET) desaparecen debido a la reacción (en promedio desaparece el 92%). Paralelamente, se observa que en promedio un 90% de los picos presentes en los extractos bromados son producto de la reacción (**Figura 26**).



**Figura 26.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del impacto de la reacción con bromo en solución sobre la composición química de los extractos.

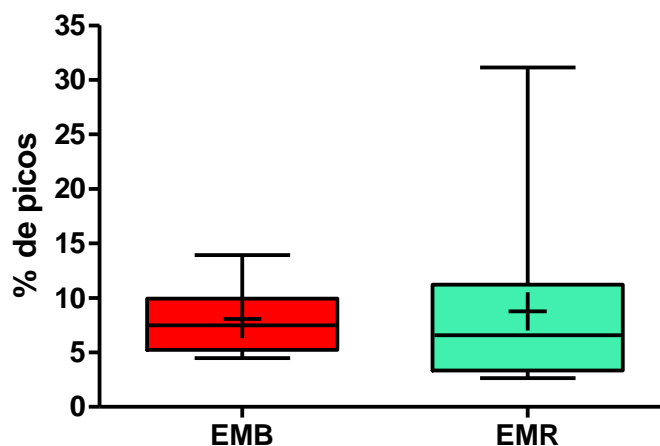
Por su parte la reacción de bromación con resina provoca la desaparición de al menos un 68 % de los picos presentes en los ETs (93 % en promedio), mientras que los picos cromatográficos que aparecen en los extractos bromados como resultado de la reacción representan el 88 % (promedio para los 15 pares de muestras) (**Figura 27**).



**Figura 27.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del impacto de la reacción con resina perbromada sobre la composición química de los extractos.

El mismo análisis puede realizarse a partir de los porcentajes promedio de picos no alterados por ambas reacciones (**Figura 28**), es decir aquellos picos que aparecen tanto en el cromatograma del extracto testigo como en el del modificado (picos que han sido alineados). En el caso de los extractos modificados con bromo en solución, el porcentaje de picos no

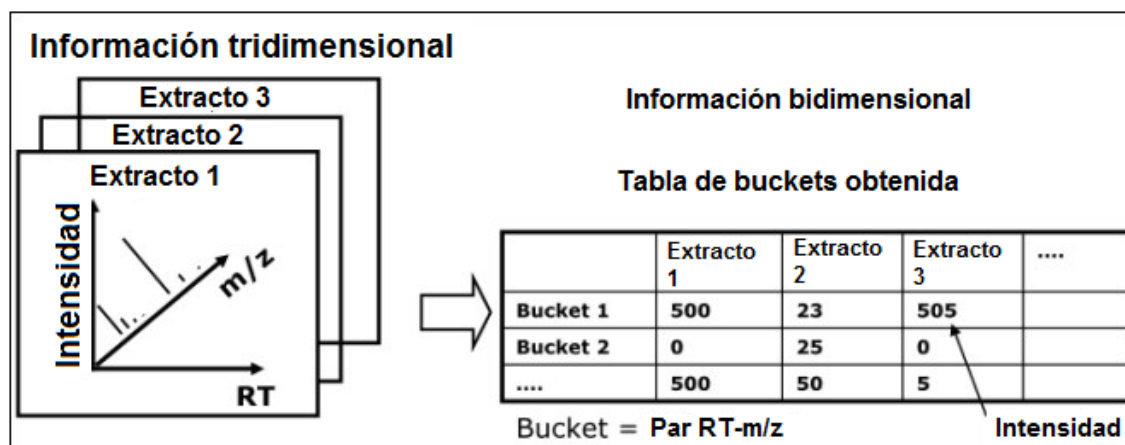
alterados promedio es del 8 % y en ningún caso supera el 15 % y el porcentaje promedio para la reacción con resina perbromada es un poco mayor (9 %), pero en el peor de los casos no supera el 31 %.



**Figura 28.** Diagrama de cajas y bigotes del porcentaje de picos no alterados por las reacciones con bromo en solución y resina perbromada en los extractos testigo.

Estos resultados demostraron que ambos protocolos de reacción produjeron cambios en los perfiles químicos de los extractos vegetales analizados presentando un alto impacto en la composición química de los mismos.

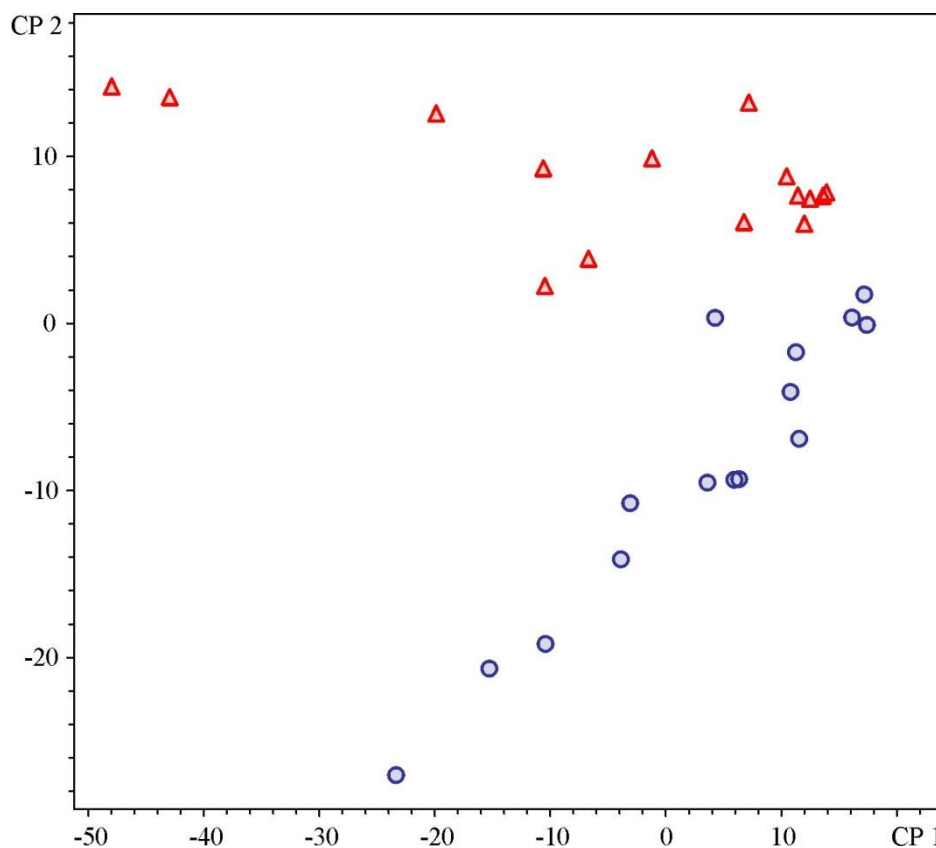
Con el fin de procesar la información contenida en los cromatogramas obtenidos por CLAE-EM en un ACP, los datos en bruto contenidos en los mismos necesitan ser transformados a un formato tabular (Información bidimensional). Esta transformación puede lograrse utilizando una técnica llamada *bucketing* (**Figura 29**). Cada punto de datos del cromatograma se describe por su tiempo de retención (RT), valor de  $m/z$  e intensidad (Información tridimensional). El *bucketing* subdivide todos los tiempos de retención especificados (RT) y los rangos de masa, en distintos pares de valores de RT- $m/z$  que se llaman *buckets*. Por lo tanto, el *bucketing* reduce drásticamente el número de puntos de datos de un análisis de CLAE-EM a una serie clara de las variables definidas por los valores estadísticos (*buckets* e intensidades) con la que se genera una matriz de datos.



**Figura 29** Transformación de información tridimensional en bidimensional (*bucketing*).

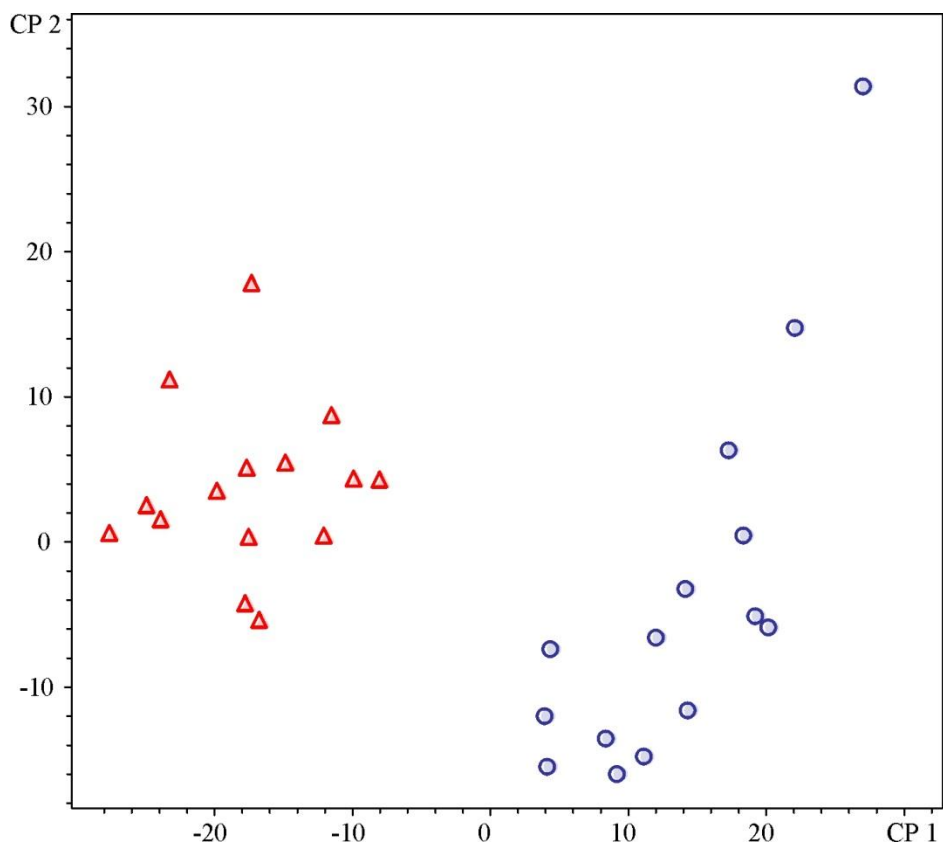
La matriz de datos, compuesta de  $m$  filas de variables (en nuestro caso *buckets*: Pares RT- $m/z$ ) y de  $n$  columnas de observaciones (en nuestro caso: extractos modificados y testigos) (**Figura 29**), fue entonces sometida a ACP.

De esta forma fueron procesados los 30 cromatogramas obtenidos por CLAE-EM utilizando el modo negativo de ionización de los 15 extractos modificados con bromo en solución y de sus respectivos extractos testigo. Con esta información, se generó el gráfico de dispersión de los dos primeros CPs, el cual muestra la separación de las muestras en dos grupos uno correspondiente a los extractos testigos y otro a los extractos bromados (**Figura 30**). Estos últimos (triángulos rojos) poseen valores de CP2 positivos, mientras que los extractos testigos (círculos azules) presentan valores negativos de CP2.



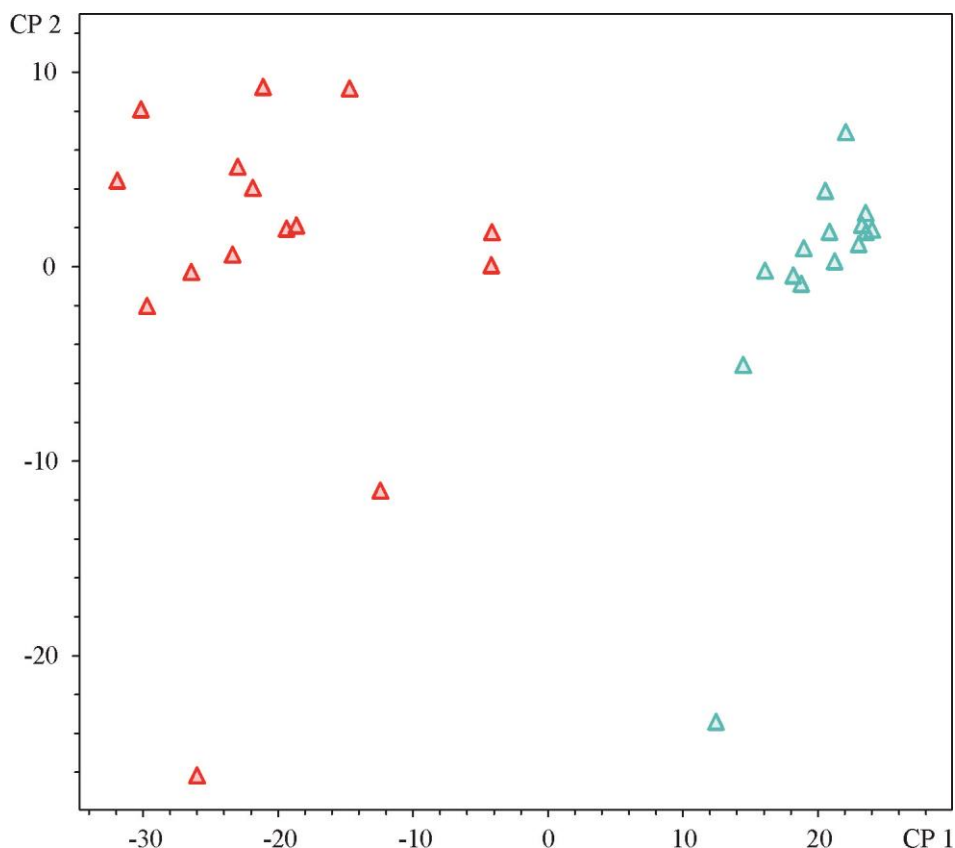
**Figura 30.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de extractos modificados con bromo en solución ( $\Delta$ ) y sus extractos testigos ( $\circ$ ).

De igual manera fueron procesados los cromatogramas de los 15 extractos modificados con resina perbromada y de sus respectivos extractos testigo. Similarmente a lo ocurrido para los extractos tratados con bromo en solución, el gráfico de dispersión de los dos primeros CPs muestra la separación de las muestras en dos grupos uno correspondiente a los extractos testigos y otro a los modificados con resina perbromada (**Figura 31**). Sin embargo, con este grupo de muestras, la separación entre los extractos modificados y los testigos se produjo en el CP1. Los extractos bromados (triángulos rojos) poseen valores de CP1 negativos, mientras que los extractos testigos (círculos azules) presentan valores positivos de CP1.



**Figura 31.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de extractos modificados con resina perbromada ( $\Delta$ ) y sus extractos testigos ( $\circ$ ).

Con el fin de comparar ambas reacciones de modificación, también se procesaron los 30 cromatogramas correspondientes al total de los extractos modificados, sean estos producidos por tratamiento con bromo en solución o con resina perbromada. Como puede observarse del gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 los extractos bromados en solución se separan de los extractos bromados con resina (**Figura 32**). La separación en dos grupos se debe principalmente a los valores de CP1, el cual como se explicó anteriormente, describe la mayor variación de los datos. Este hecho podría deberse a la diferente reactividad de ambos agentes bromantes antes mencionada.



**Figura 32.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de extractos modificados con bromo en solución ( $\Delta$ ) y extractos modificados con resina perbromada ( $\triangle$ ).

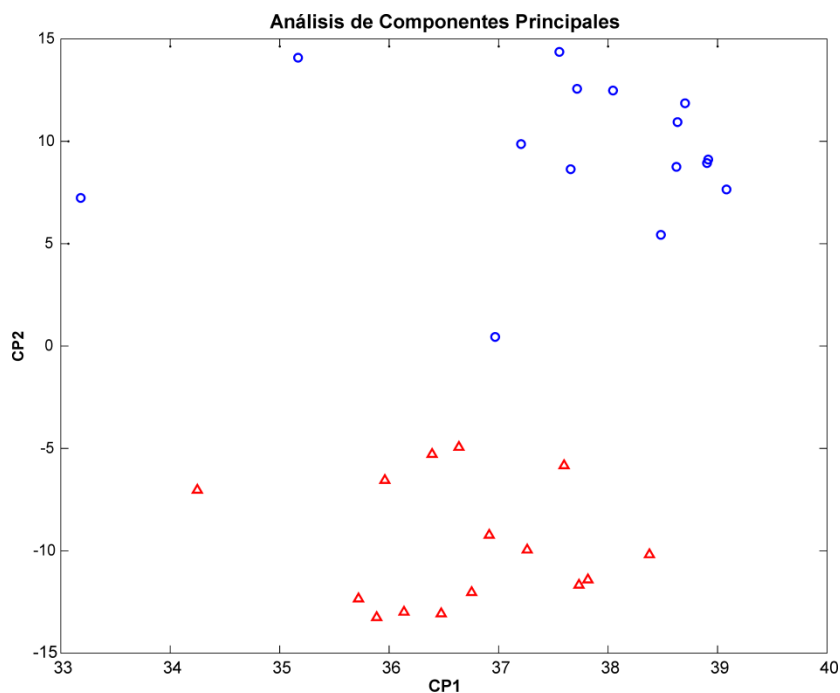
### 3.2.2.2 Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados con bromo mediante RMN de $^1\text{H}$

A pesar de que la resonancia magnética nuclear no es tan sensible como otras técnicas analíticas como la cromatografía gaseosa y la cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masa, es más reproducible, no es destructiva, cubre rangos dinámicos más amplios y además la preparación de la muestra es más simple y la obtención de espectros es más rápida. El constante desarrollo de la espectroscopía de RMN ha permitido que la misma pueda ser utilizada como herramienta para la construcción de huellas dactilares. La complementación de esta técnica con métodos estadísticos como ACP<sup>125,126</sup> o mínimos cuadrados parciales<sup>127</sup> permite realizar análisis cuantitativos de mezclas complejas sin necesidad de separación cromatográfica previa.<sup>128,129</sup>

Para comparar las composiciones químicas de los extractos modificados y de cada uno de los correspondientes extractos testigos, se hicieron espectros de RMN de protones (RMN de  $^1\text{H}$ ) de cada uno de los 15 extractos modificados con bromo en solución, de los 15 extractos modificados con resina perbromada y de cada uno de los correspondientes extractos testigo dando un total de 60 espectros. Los espectros de estas 60 mezclas complejas se compararon utilizando ACP.

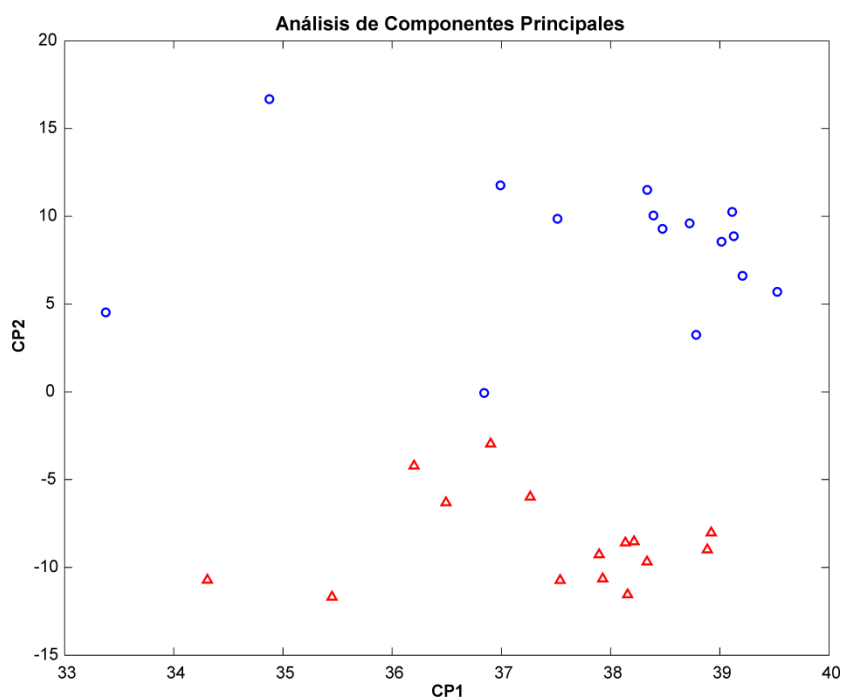
Con el objeto de realizar este análisis, inicialmente los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> De esta manera los espectros fueron convertidos a un formato apropiado para su análisis multivariado usando el código escrito MATLAB (Versión 7). Posteriormente se realizó el análisis estadístico multivariado procesando los datos obtenidos a través de TOMCAT (*Toolbox for multivariate calibration technique*)<sup>131</sup> obteniendo los descriptores (CPs), los cuales acumulan la varianza total de la población.

El gráfico de dispersión de los dos primeros CPs para los extractos modificados con bromo en solución muestra la separación de las muestras en dos grupos (**Figura 33**), uno correspondiente a los extractos testigos y otro a los modificados. Estos últimos (triángulos rojos) poseen valores de CP1 positivos y de CP2 negativos, mientras que los extractos testigos (círculos azules) presentan valores positivos tanto del CP1 como del CP2.



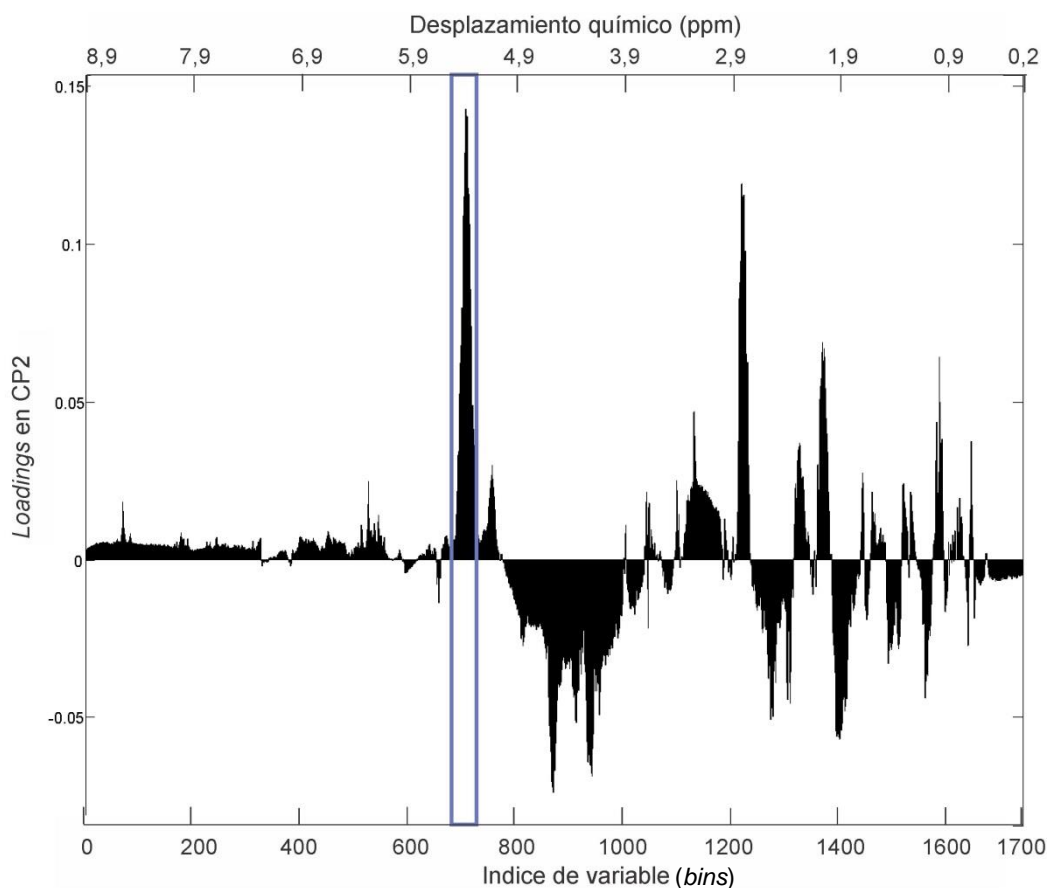
**Figura 33.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de extractos modificados con bromo en solución (▲) y sus extractos testigos (○).

Por su parte, el gráfico de dispersión de los dos primeros CPs para los extractos modificados con resina perbromada también muestra la separación de las muestras en dos grupos (**Figura 34**), uno correspondiente a los extractos testigos y otro a los modificados. Igual que los extractos modificados con bromo en solución, los extractos bromados con resina (triángulos rojos) también poseen valores de CP1 positivos y CP2 negativos, mientras que los extractos testigos (círculos azules) presentan valores positivos tanto del CP1 como del CP2.



**Figura 34.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de extractos modificados con resina perbromada ( $\Delta$ ) y sus extractos testigos ( $\circ$ ).

Puesto que los grupos de extractos se diferencian principalmente por sus valores del CP2, se estudió el gráfico de *loadings* de este CP (**Figura 35**). Los gráficos de *loadings* visualizan las variables que son responsables de la distribución de muestras en el gráfico de resultados en el plano del modelo seleccionado, es decir resumen la contribución de las variables originales a cada CP, de esta forma describen cuales picos en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (transformados en *bins*) diferencian más a las muestras en estudio.



**Figura 35.** Gráfico de *loadings* del CP2 de extractos modificados con bromo en solución y extractos no modificados.

El gráfico de *loadings* del CP2 reveló que los *bins* con mayor influencia sobre este componente principal son los que van desde 660 a 720 los cuales corresponden a la zona del espectro con valores de desplazamiento químico entre 5,3 y 5,7 ppm (**Figura 35**, zona del gráfico resaltada). Esta es una zona de desplazamiento químico de señales de dobles enlaces, que son uno de los grupos blanco de la reacción de bromación. Esto se condice con los valores positivos que toman los CP2 para los extractos testigos, dado que estarán más influenciados por estos *bins* correspondientes a dobles enlaces (que como mencionáramos previamente es un grupo de alta presencia en PNs). Al contrario, los valores de CP2 para los extractos modificados, en los que supuestamente los dobles enlaces han reaccionado con bromo, tomaran valores menores.

Considerando la totalidad de los resultados presentados en esta sección sugieren que a pesar de que las mezclas de partida y producto son complejas y de composición mayoritariamente desconocida, existen diferencias entre sus composiciones químicas y que estas diferencias se centran en uno de los grupos blanco de la modificación química.

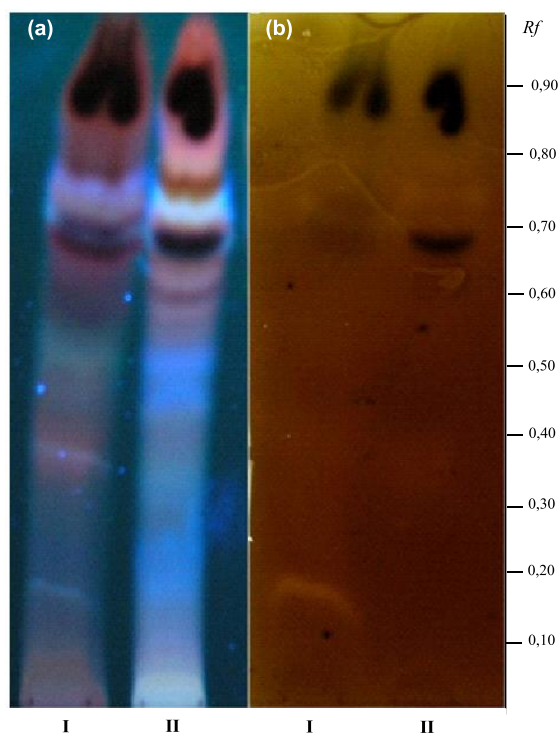
### 3.2.3 Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de extractos modificados con bromo en solución y con resina perbromada

Debido a los cambios que se observaron por RMN de  $^1\text{H}$  y por CLAE-EM en los perfiles químicos de los extractos debido a la reacción de bromación, resulta interesante analizar si los mismos se reflejan en una alteración en los perfiles de actividad biológica. Con este fin, se utilizaron ensayos autográficos previamente descritos para detectar inhibidores de acetilcolinesterasa,<sup>132</sup> xantina oxidasa<sup>133</sup> y  $\beta$ -glucosidasa<sup>65</sup> y el ensayo para detección de inhibidores de tirosinasa desarrollado durante esta tesis (Sección 3.1.1). Además a nivel celular se estudió la actividad reguladora de la virulencia de *Salmonella* (represión del sistema PhoP/PhoQ),<sup>54</sup> realizadas en colaboración con el grupo de la Dra. Eleonora García Vescovi, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR).

En todos los casos, las actividades se evaluaron sembrando 200  $\mu\text{g}$  de la mezcla y desarrollando las cromatografías en capa delgada en DCM:MeOH (80:20), observando que prácticamente todos los extractos testigos y modificados de las 7 especies fueron inactivos excepto el extracto modificado de *Medicago lupulina* frente a la enzima  $\beta$ -Glucosidasa.

#### 3.2.3.1 Actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -Glucosidasa

El extracto de *Medicago lupulina L.*, modificado con bromo en solución mostró una tenue zona de inhibición de la enzima  $\beta$ -Glucosidasa con  $R_f=0,18$ , la cual está ausente en el extracto de partida (**Figura 36**).



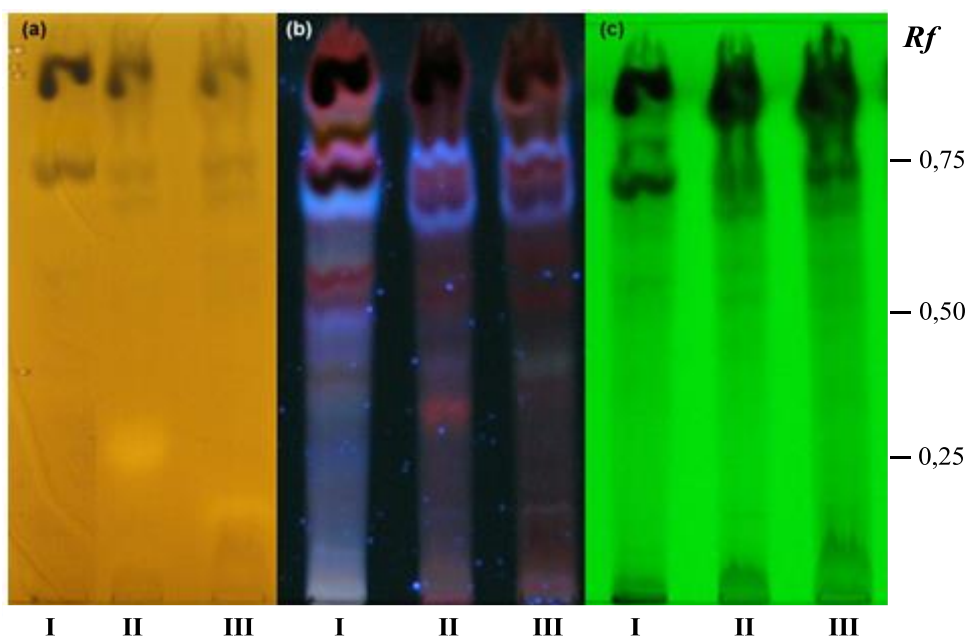
**Figura 36.** CCD revelada (a) bajo luz UV  $_{365\text{ nm}}$  y (b) por autografía de  $\beta$ - Glucosidasa del extracto bromado (I) y el extracto testigo (II) de *M. lupulina*. Sistema de solventes DCM: MeOH (80:20).

De estos resultados se puede advertir que la reacción de bromación en solución introdujo cambios en las propiedades biomoleculares del extracto de *M. lupulina*, por lo que se decidió proseguir con el fraccionamiento bioguiado para obtener mayor información del mismo.

### 3.2.4 Fraccionamiento bioguiado del extracto modificado de *Medicago lupulina* L.

Dado que la reacción de bromación del extracto de *Medicago lupulina* L. se llevó a cabo en pequeña escala (200 mg de extracto de partida), la cantidad de extracto modificado resultó insuficiente para iniciar un fraccionamiento bioguiado por lo que fue necesario repetir la reacción a mayor escala (4,8 g) utilizando las mismas condiciones de reacción.

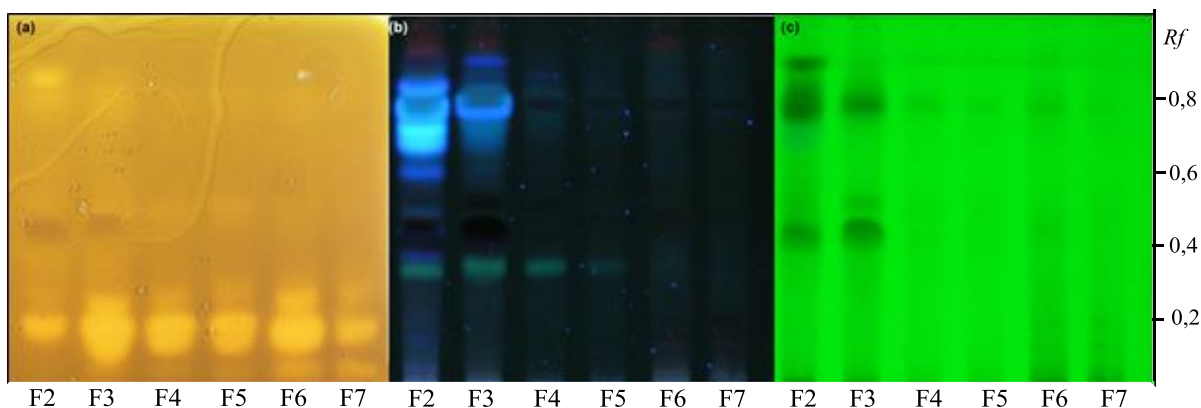
El extracto obtenido en mayor escala y el extracto obtenido previamente en pequeña escala fueron evaluados por autografía de  $\beta$ -glucosidasa junto con el extracto nativo de *M. lupulina* observando que el extracto en mayor escala producía un halo de inhibición a mayor  $R_f$  que el originalmente observado en el extracto bromado en pequeña escala (**Figura 37**).



**Figura 37.** Comparación por CCD. (a) autografía de  $\beta$ -glucosidasa. (b)  $UV_{365\text{ nm}}$ . (c)  $UV_{254\text{ nm}}$  de fracción DCM del extracto nativo de *M. lupulina* (I), del extracto modificado de *M. lupulina* escalado (II) y del extracto modificado de *M. lupulina* obtenido a pequeña escala (III). FM= DCM:MeOH (80:20).

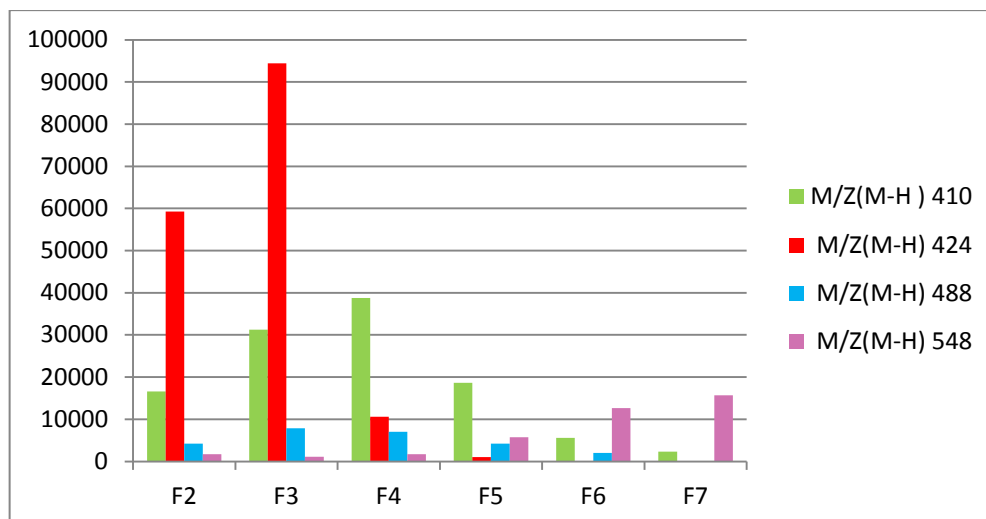
En función de este análisis se decidió proseguir con el fraccionamiento, debido a que si bien se observaban diferencias en el perfil de actividad del nuevo extracto modificado generado, aun se observaba un cambio en la actividad biológica con respecto al extracto nativo de partida.

A continuación el extracto diclorometánico de *M. lupulina* modificado con bromo en solución se fraccionó por cromatografía en columna (CC) de Sephadex LH-20 utilizando como eluyente MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hexano (2:1:1). De este procedimiento se obtuvieron 56 fracciones las cuales fueron reagrupadas en función de la similitud de sus perfiles químicos y de actividad en 12 nuevas fracciones, de las cuales seis mostraron halos de inhibición de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (fracciones 2 a 7). Como se observa en la **Figura 38**, este análisis muestra halos de inhibición en el punto de siembra y a *Rf*s de 0,15 y 0,3: aparentemente, la actividad que parecía haber desaparecido con el escalado de la reacción vuelve a ser evidenciada. Esto podría deberse a un aumento en la concentración de los compuestos activos, producido por el fraccionamiento.



**Figura 38.** Comparación por CCD. Siembras. 100  $\mu\text{g}$  de cada fracción activa obtenida cromatografía en columna de Sephadex LH-20 (a) bioautografía de  $\beta$ -glucosidasa. (b) UV  $_{365\text{ nm}}$ . (c) UV  $_{254\text{ nm}}$ . Fase móvil= DCM:MeOH (80:20).

Para tener más información sobre la composición química, las seis fracciones activas se analizaron por espectrometría de masa. Las fracciones fueron suspendidas en el mismo volumen del solvente, con el fin de conservar la proporción de componentes presentes en cada fracción. Entre los iones moleculares presentes en las diferentes fracciones se encuentran 4 iones moleculares que tienen el patrón isotópico característico de los compuestos que contienen bromo en su estructura. En la **Figura 39**, puede visualizarse que la intensidad del ion molecular con  $m/z = 424$  presenta mayor intensidad en la fracción 3 que es una de las más activas, el ion molecular con  $m/z = 410$  en la fracción 4, el ion molecular con una  $m/z = 488$  en las fracciones 3 y 4, y el ion molecular con  $m/z = 548$  va aumentando su intensidad hasta la fracción 7.



**Figura 39** Histograma de frecuencias para las intensidades absolutas de fragmentos con patrón isotópico característico de compuestos bromados presentes en las fracciones activas obtenidas a partir del fraccionamiento realizado al escalado de la reacción de bromación en solución para *M. lupulina*.

El análisis por RMN de cada una de estas seis fracciones mostró principalmente señales de grasa y un sinnúmero de señales casi imperceptibles pertenecientes probablemente a varios compuestos presentes en muy baja concentración. A pesar del escalado realizado previamente, las masas de estas fracciones activas oscilaron entre 2,4 mg y 11,1 mg. De acuerdo al análisis de autografía, EM y RMN, la fracción 3 era la más interesante en cuanto a actividad y aparente grado de pureza. Esta fracción, de 6 mg, fue sometida a cromatografía en capa delgada preparativa en silica gel utilizando DCM:MeOH (80:20) como eluyente. Sin embargo las fracciones obtenidas fueron de masas insuficientes para permitir su análisis posterior (menos de 1 mg). En conjunto estos resultados sugieren que las fracciones seleccionadas incluyen compuestos muy activos porque a pesar de su baja concentración son claramente detectables por bioautografía, sin embargo esta baja concentración impidió su aislamiento en suficiente cantidad como para realizar su caracterización (química y biológica). A pesar de esto, los datos de espectrometría de masa de las fracciones activas, así como los cambios en actividad producidos por la reacción (evidenciados por autografía) sugieren que los compuestos responsables de la actividad incluyen bromo en su estructura.

Los resultados obtenidos con los extractos bromados en esta sección y en trabajos previos del grupo<sup>20</sup> indican que la reacción de bromación resulta interesante para generar compuestos bioactivos. El principal inconveniente encontrado hasta el momento con esta reacción está relacionado a la dificultad experimentada para lograr el aislamiento de los

nuevos copuestos bioactivos a partir de los extractos bromados. Dada la reactividad del bromo, es probable que a partir de cada compuesto presente en la mezcla de partida se generen varios compuestos bromados, incrementando significativamente la complejidad de la mezcla. Es de esperar, además, que este aumento en complejidad se asocie con una disminución en la concentración promedio de todos los componentes y con un aumento en la reactividad (inestabilidad) de una parte de los compuestos productos. La combinación de estos cambios, probablemente sea un factor determinante de las dificultades experimentadas para el aislamiento de productos bromados a partir de extractos activos. Es probable que estos aspectos puedan ser estudiados utilizando como material de partida a mezclas naturales de complejidad inferior a los extractos crudos.

### 3.2.5 Modificación de aceites esenciales con bromo

En esta sección se incorporan como material de partida una serie de aceites esenciales como mezclas naturales de menor complejidad que los extractos utilizados previamente. Si bien los aceites esenciales son en sí mismos mezclas naturales complejas,<sup>134, 135</sup> en comparación con los extractos crudos previamente utilizados, contienen un menor número de componentes más similares entre sí, lo que facilita un análisis más exhaustivo de su composición. De esta manera se podrían medir si efectivamente la reacción aumenta el número de componentes de las mezclas, además de producir cambios en la composición/bioactividad.

Con este objetivo, se realizó la bromación en solución de 32 aceites esenciales (AEs), los cuales se detallan en la **Tabla 11**. De manera similar a lo observado para las bromaciones de extractos crudos, los porcentajes de recuperación de los aceites esenciales modificados mediante la reacción de bromación en solución son mayores al 100%. Esto sugiere un aumento en el peso molecular promedio de los constituyentes de los extractos que podría ser atribuible a la incorporación de bromo en sus estructuras.

**Tabla 11.** Porcentaje de masas recuperadas de AEBs relativas a las masas de los AEs.

Aceite esencial de partida	% Rendimiento
<i>Abies alba</i> Mill.	179,25
<i>Artemisia absinthium</i> L.	164,27
<i>Allium sativum</i> L.	164,57
<i>Ocimum basilicum</i> L.	147,75
<i>Citrus aurantium</i> L.	166,48
<i>Pimenta racemosa</i> (Mill.) J.W.Moore	184,75

Aceite esencial de partida	% Rendimiento
<i>Citrus bergamia</i> Risso & Poit.	198,69
<i>Cinnamomum verum</i> J.Presl	188,54
<i>Cinnamomum cassia</i> (Nees & T.Nees) J.Presl	158,93
<i>Cedrus sp.</i>	233,43
<i>Juniperus virginiana</i> L.	146,61
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	275,39
<i>Coriandrum sativum</i> L.	170,98
<i>Juniperus communis</i> L.	163,99
<i>Artemisia dracunculus</i>	161,76
<i>Eucaliptus globulus</i> Labill.	134,23
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	154,56
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	196,93
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	196,99
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	168,77
<i>Citrus limonum</i> Risso	169,50
<i>Litsea cubeba</i> (Lour.) Pers.	202,22
<i>Mentha arvensis</i> L.	145,01
<i>Melaleuca viridiflora</i> (Sol.) Gaertn.	121,34
<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	174,29
<i>Origanum vulgare</i> L.	141,64
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W.Watson	245,50
<i>Pogostemon cablin</i> Benth.	153,61
<i>Pinus sylvestris</i> L.	179,70
<i>Salvia officinalis</i> L.	145,31
<i>Vetiveria zizanioides</i> (L.) Roberty	152,70
<i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook.f. & Thomson	183,21

### 3.2.6 Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con bromo.

Al igual que para extractos crudos, para este análisis se utilizaron técnicas espectroscópicas y cromatográficas. Dentro de las técnicas espectroscópicas, se utilizó nuevamente la resonancia magnética nuclear (RMN), pero para los análisis cromatográficos, en lugar de cromatografía CLAE-EM se prefirió utilizar cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM).

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masa es la técnica más utilizada y bien establecida para el análisis de aceites esenciales, debido al desarrollo de sistemas de fácil manejo y potentes en cuanto a sensibilidad, adquisición y procesamiento de datos, y sobre todo, a su relativamente bajo costo. La gran mayoría de las

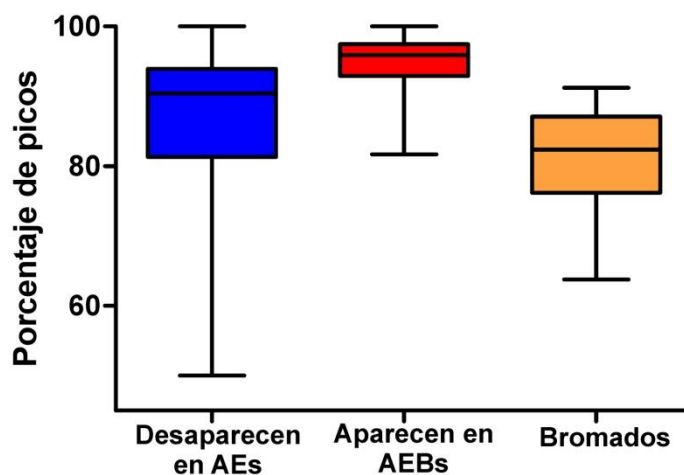
aplicaciones de CG-EM utilizan CG capilar unidimensional con detector simple cuadrupolo e ionización por impacto electrónico (IE).

La CG-EM combina la capacidad de separación de la cromatografía gaseosa y la capacidad de identificación de la espectrometría de masa. Esta combinación resulta muy útil para el análisis de mezclas de composición desconocida ya que facilita la determinación inequívoca de la presencia de un mismo compuesto en diferentes mezclas. Ante la observación en diferentes muestras de picos con idénticos  $t_R$ , la comparación de los espectros de masa permite evaluar si se trata o no de la misma molécula, por su patrón de fragmentación característico en el caso de impacto electrónico. La proliferación de aplicaciones CG-EM es también el resultado de la aparición y actualización permanente de bibliotecas de espectros de masa comercialmente disponibles y fáciles de manejar con el fin de facilitar la identificación de los compuestos separados (por ejemplo, el NIST / EPA / NIH 2014; Registro WILEY 2006; MassFinder 2007; y diversas versiones impresas como Jennings y Shibamoto, 1980; Joulain y König, 1998; y Adams, 1989, 1995, 2007 todas incluyen los índices de retención).

### **3.2.6.1 Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con bromo mediante CG-EM.**

Para realizar este análisis se realizaron los cromatogramas mediante CG-EM en idénticas condiciones para los AEs y los AEBs. Posteriormente se realizó el recuento de picos de todos los cromatogramas, cada AEB fue comparado con su respectivo AE en búsqueda de aquellos picos que fueran conservados luego de la reacción. De esta forma al igual que para extractos modificados con bromo, se obtuvieron los porcentajes de picos que desaparecen y aparecen luego de la reacción en AEs y AEBs, respectivamente.

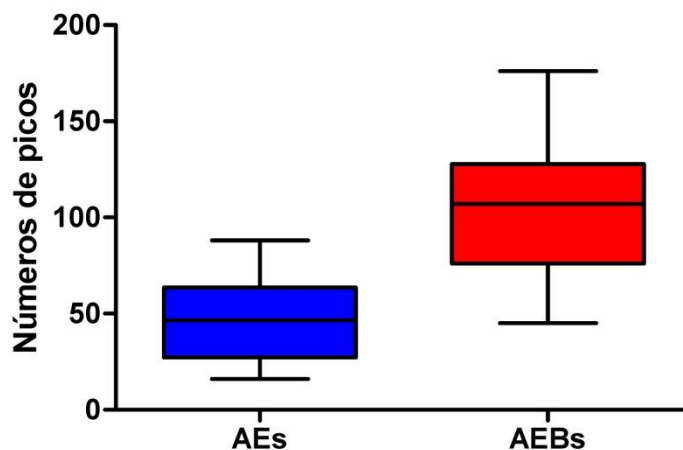
En este análisis se detectaron importantes diferencias en los perfiles químicos de los AEs respecto a los AEBs, observando que en promedio el 90 % de los picos detectados en los cromatogramas de los AEs desaparecen como resultado de la reacción y que el 96 % de los picos presentes en los AEBs están ausentes en los AEs, es decir representan compuestos nuevos generados por la reacción (**Figura 40**). Demostrando de esta forma el alto impacto que tiene la reacción de bromación en la alteración de la composición química de los aceites esenciales.



**Figura 40.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del impacto y el éxito de la reacción con bromo en solución en la composición química de los aceites esenciales modificados.

Posteriormente, como el fin de esta reacción aplicada no es solo modificar los AEs sino además incorporar bromo en las estructuras químicas presentes en los mismos, se realizó un análisis más exhaustivo de todos aquellos picos que aparecieron luego de la reacción. Para lo cual se analizó individualmente cada uno de estos “nuevos” compuestos en búsqueda del patrón isotópico característico de compuestos bromados. Como se observa en la **Figura 40**, se encontró que en promedio el 64 % de los compuestos generados incorporaron al menos un átomo de bromo, esto demostró el éxito de la reacción en cuanto a la incorporación de esta funcionalidad.

Además se observó que en todos los casos la reacción produjo un aumento en el número de picos. En la **Figura 41** se observa que el número promedio de compuestos detectados en las mezclas aumenta de 46 (AEs) a 107 (AEBs) debido a la reacción de bromación. Esto sugiere que, en promedio, dos compuestos son generados a partir de cada precursor natural.



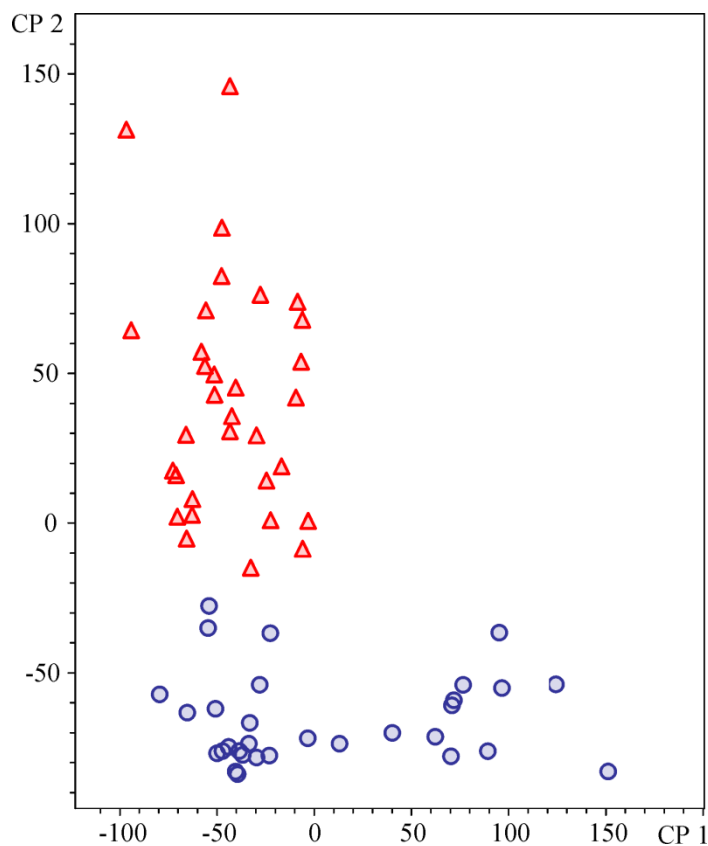
**Figura 41.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del impacto de la reacción con bromo en solución en el número de picos de los aceites esenciales modificados.

Considerando que se sometieron a la reacción de bromación 32 aceites esenciales que contienen en promedio 46 compuestos (de acuerdo con los datos promedio de GC-MS, **Figura 41**) de los cuales se modificó en promedio el 90 % de sus componentes (**Figura 40**), podría decirse que en esta serie de reacciones se han modificado alrededor de 1200 compuestos de origen natural. Debe destacarse, sin embargo, que es muy probable que algunos componentes de los aceites esenciales de partida estén presentes en más de un aceite esencial, por lo tanto el número total de compuestos diferentes que se modificaron será inferior, aunque es probable que sea de varios cientos.

Considerando que se obtuvieron los respectivos 32 aceites esenciales bromados que contienen, en promedio, 107 compuestos cada uno (96 % de los cuales no estaban en los AEs de partida y 64 % de los cuales son bromados (**Figuras 40 y 41**)). Podríamos decir que en total en esta serie de ensayos se produjeron alrededor de 3200 compuestos, de los cuales aproximadamente 2100 son bromados. Nuevamente, la redundancia en la composición química de los materiales de partida probablemente haga que una proporción más o menos significativa de los mismos sean compuestos repetidos (por provenir de compuestos que estaban presentes en más de uno de los aceites esenciales analizados).

Además de estos análisis cuantitativos, los datos obtenidos por CG-EM fueron procesados estadísticamente mediante ACP. Los datos obtenidos (tridimensionales) fueron transformados previamente a formato tabular (bidimensional) al igual que en el caso de los cromatogramas de CLAE-EM de extractos. En la **Figura 42** se observa que a través del ACP

se logró separar a la población en dos grupos uno correspondiente a los AEBs (triángulos rojos) y otro a los AEs (círculos azules).



**Figura 42.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de aceites esenciales modificados con bromo en solución ( $\Delta$ ) y sus extractos testigos ( $\circ$ ).

Si bien el gráfico de *loadings* del CP2 no es indicativo del motivo por el cual se da la separación en ese componente, a grandes razgos puede observarse que los aceites esenciales bromados se relacionan con algunos *buckets* con altos tiempos de retención y relación  $m/z$  que tienen valores de CP2 positivos.

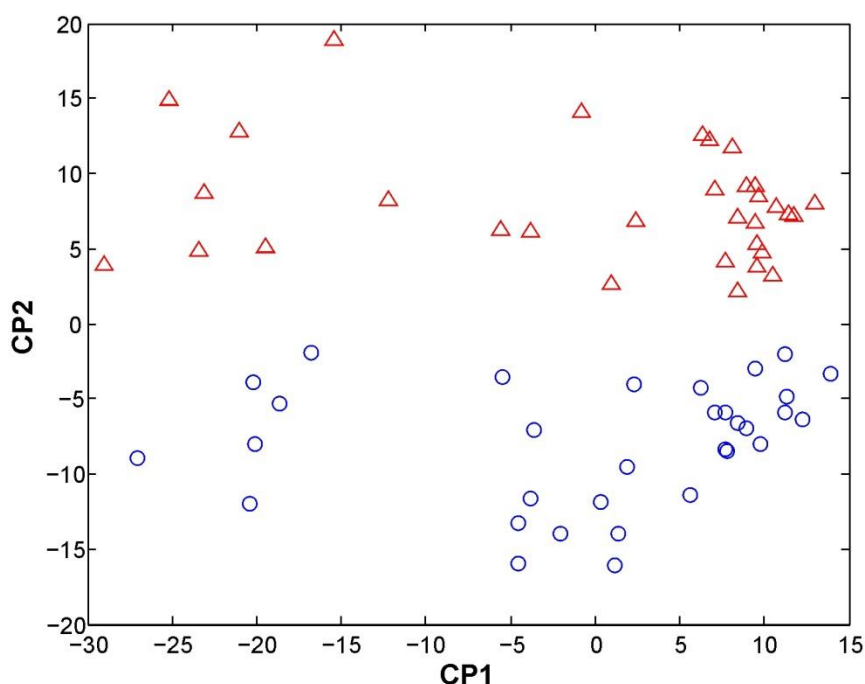
### 3.2.6.2 Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con bromo mediante RMN de $^1\text{H}$

Para comparar las composiciones químicas de los AEBs y de sus correspondientes AEs de partida, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de las 64 muestras fueron sometidos a análisis multivariado utilizando ACP.

Inicialmente, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> De esta manera los espectros son convertidos a un formato apropiado para su

análisis multivariado usando el código escrito MATLAB (Versión 7). Posteriormente se realizó el análisis estadístico multivariado procesando los datos obtenidos a través de TOMCAT (*Toolbox for multivariate calibration technique*).<sup>131</sup> De esta manera se obtienen los descriptores (CPs), los cuales acumulan la varianza total de la población.

El gráfico de dispersión de los dos primeros CPs (**Figura 43**), muestra la separación de las muestras en dos grupos, uno correspondiente a los AEs y otro a los AEBs. Estos últimos (triángulos rojos) poseen valores de CP2 positivos, mientras que los AEs (círculos azules) presentan valores negativos para el CP2.

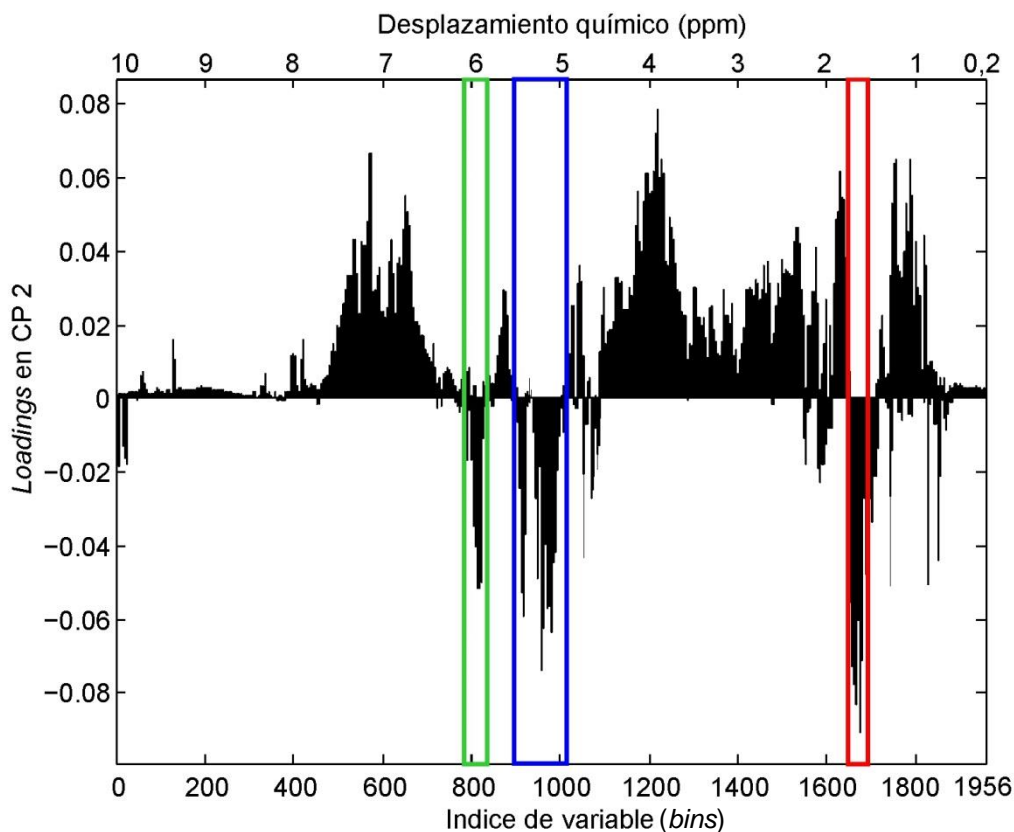


**Figura 43.** Gráfico de dispersión del CP2 respecto del CP1 de AEBs (  ) y sus AEs (  ).

Puesto que los grupos de aceites esenciales se diferencian principalmente por sus valores del CP2, con el fin de analizar cuales picos en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (transformados en *bins*) diferencian más a las muestras en estudio, se estudió el gráfico de *loadings* de este CP.

El gráfico de *loadings* del CP2 reveló que los *bins* con mayor influencia sobre este componente principal son los que van desde 860 hasta 1020 los cuales corresponden a la zona del espectro con valores de desplazamiento químico entre 4,9 y 5,7 ppm (**Figura 44**, recuadro azul). Esta es una zona de desplazamiento químico de señales de dobles enlaces, que son uno de los grupos blanco de la reacción de bromación. A campos más bajos se presenta otra zona de influencia sobre el CP2 que abarca los *bins* que van desde 640 a 780 los cuales

corresponden a la zona del espectro con valores de desplazamiento químico entre 5,8 y 6,1 ppm (**Figura 44**, recuadro verde). Esta es una zona de desplazamiento químico también de dobles enlaces pero conjugados con anillos aromáticos. Esto se condice con los valores negativos de CP2 para los AEs, dado que estarán más influenciados por estos *bins* correspondientes a dobles enlaces (que como mencionáramos previamente es un grupo de alta presencia en PNs). Al contrario, los valores de CP2 para los AEBs, en los que supuestamente los dobles enlaces han reaccionado con bromo, tomaran valores menos negativos.



**Figura 44.** Gráfico de *loadings* del CP2 de AEs y AEBs.

Se encontró además otro grupo de *bins* con influencia sobre CP2 que van desde 1660 a 1680 los cuales corresponden a la zona del espectro con valores de desplazamiento químico entre 1,6 y 1,7 ppm (**Figura 44**, recuadro rojo). Esta es una zona de desplazamiento químico de señales de protones de metilos de alcanos en posición  $\alpha$  a dobles enlaces, esto indicaría que al ser modificados los dobles enlaces por la reacción de bromación, los protones de estos grupos metilo cambiarían de desplazamiento químico probablemente hacia campos más bajos, aunque por ser una zona muy congestionada no puede encontrarse ese grupo de señales en el gráfico de *loadings* del CP2.

Estos resultados sugieren que a pesar de que las mezclas de partida y producto son complejas y de composición mayoritariamente desconocida, existen diferencias entre sus composiciones químicas y que estas diferencias se centran en grupos blanco de la modificación química o en grupos adyacentes a estos.

### 3.2.7 *Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de aceites esenciales modificados con bromo*

Con el objetivo de evaluar los cambios en las propiedades biomoleculares introducidos por la reacción de bromación, se analizaron los 32 aceites esenciales modificados utilizando como testigo el aceite esencial de partida correspondiente, lo que da un total de 64 muestras. Al igual que para extractos modificados, la evaluación de propiedades biomoleculares de estas mezclas se realizó utilizando ensayos autográficos sobre placas cromatográficas. Para este grupo de aceites esenciales, se evaluó el efecto de la reacción sobre las propiedades antioxidantes de las mezclas a través de la captación del radical DPPH y del radical anión superóxido. Además se evaluaron las propiedades de inhibición de las enzimas xantina oxidasa,  $\beta$ -glucosidasa, acetilcolinesterasa y tirosinasa.

En todos los casos, las actividades se evaluaron sembrando 200  $\mu$ g de la mezcla y desarrollando las cromatografías en capa delgada un sistema de solventes hexano:AcOEt (9:1).

#### 3.2.7.1 **Detección de compuestos antioxidantes**

Este análisis involucró el estudio de las propiedades de los aceites esenciales para captar dos especies reactivas, el radical DPPH y el radical anión superóxido.

En la **Tabla 12** se resumen las actividades de captación de DPPH observadas para este conjunto de 64 AEs, se muestran solamente aquellos que han presentado al menos un halo de inhibición para el aceite esencial natural o modificado (este formato se hará extensivo al resto de actividades biológicas evaluadas).

**Tabla 12.** Resumen de halos de captadores de DPPH obtenidos para aceites esenciales (AEs) naturales y modificados mediante la reacción de bromación en solución

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( <i>R<sub>f</sub></i> ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>A. alba</i>	testigo	0,14; 0,21	2	2	0
	bromado	0,14; 0,21			
<i>A. absinthium</i>	testigo	0; 0,07; 0,19; 0,24; 0,48; 0,62; 0,70	7	5	1
	bromado	0; 0,07; 0,19; 0,24; 0,35			

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente (Rf) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>A. sativum</i>	testigo	0; 0,04; 0,18; 0,52	4	5	1
	bromado	0; 0,04; 0,18; 0,52; 0,54			
<i>O. basilicum</i>	testigo	0,07; 0,23; 0,70	3	1	0
	bromado	0,07			
<i>P. racemosa</i>	testigo	0; 0,20	2	2	0
	bromado	0; 0,20			
<i>C. verum</i>	testigo	0; 0,20	2	2	0
	bromado	0; 0,20			
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,03; 0,04; 0,21	3	5	3
	bromado	0,03; 0,21; 0,38; 0,43; 0,49			
<i>J. virginiana</i>	testigo	0,21	1	3	1
	bromado	0; 0,21; 0,30			
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0,11; 0,20	2	2	0
	bromado	0,11; 0,20			
<i>C. sativum</i>	testigo	0,32	1	0	0
	bromado				
<i>A. dracunculus</i>	testigo	0,01; 0,04	2	3	3
	bromado	0,05; 0,06; 0,07			
<i>F. vulgare</i>	testigo		0	5	5
	bromado	0,01; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07			
<i>L. angustifolia</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,17; 0,25; 0,59			
<i>C. citratus</i>	testigo	0; 0,42	2	0	0
	bromado				
<i>C. aurantifolia</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,01; 0,15; 0,21			
<i>C. limonum</i>	testigo		0	2	2
	bromado	0; 0,15			
<i>L. cubeba</i>	testigo	0,19; 0,33; 0,43	3	0	0
	bromado				
<i>M. arvensis</i>	testigo	0,22; 0,28	2	3	1
	bromado	0; 0,22; 0,38			
<i>M. viridiflora</i>	testigo		0	4	4
	bromado	0; 0,08; 0,14; 0,21			
<i>M. fragrans</i>	testigo	0; 0,20; 0,36	3	3	1
	bromado	0; 0,20; 0,26			
<i>O. vulgare</i>	testigo	0; 0,38	2	3	1
	bromado	0; 0,38; 0,49			
<i>P. cablin</i>	testigo	0,15; 0,66	2	0	0
	bromado				
<i>P. sylvestris</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,15; 0,17; 0,59			
<i>S. officinalis</i>	testigo	0,19	1	4	3
	bromado	0; 0,19; 0,35; 0,47			
<i>V. zizanioides</i>	testigo	0; 0,16; 0,68	3	0	0
	bromado				
<i>C. odorata</i>	testigo	0,15; 0,24; 0,32; 0,65	4	2	0
	bromado	0,15; 0,65			
Número total de halos de captadores de DPPH			51	65	35

Como se puede observar el número total de halos de captación de DPPH observado en el conjunto de AEs bromados (65) es mayor que el número total observado en el conjunto de AEs de partida (51).

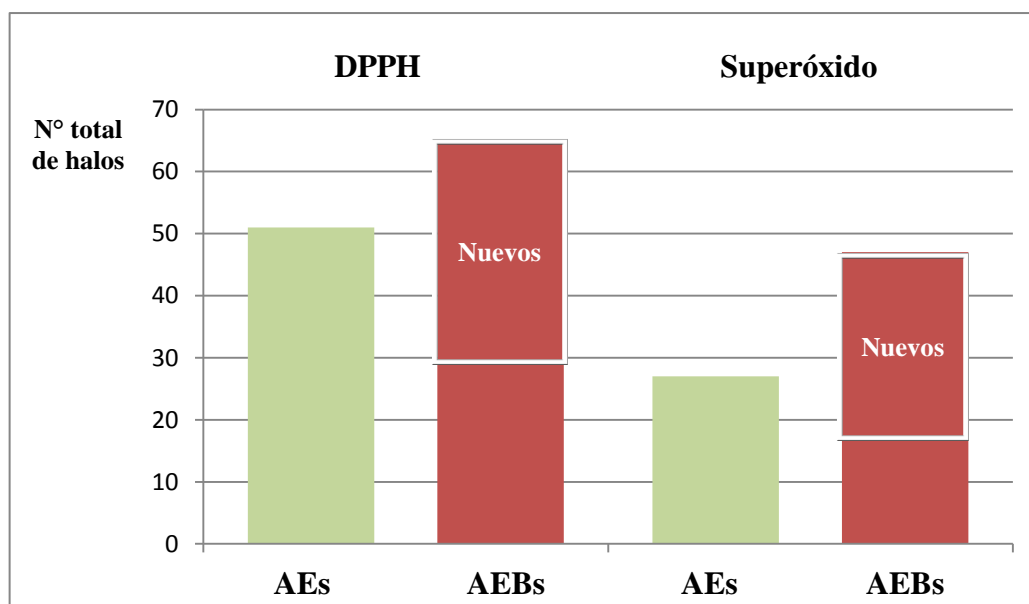
En la **Tabla 13** se resumen las actividades de captación de superóxido observadas para este conjunto de AEs. Nuevamente se puede observar los aceites esenciales analizados presentaron un mayor número de halos de inhibición para la actividad de radical superóxido luego de la reacción de bromación.

**Tabla 13.** Resumen de halos de captadores de radical superóxido obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( <i>Rf</i> ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>A. alba</i>	testigo		0	2	2
	bromado	0; 0,02			
<i>A. absinthium</i>	testigo	0,19	1	2	1
	bromado	0,19; 0,24			
<i>A. sativum</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,45			
<i>O. basilicum</i>	testigo	0,08; 0,21	2	0	0
	bromado				
<i>P. racemosa</i>	testigo	0,03; 0,17; 0,21	3	4	1
	bromado	0,03; 0,10; 0,17; 0,21			
<i>C. verum</i>	testigo	0,03; 0,21	2	3	1
	bromado	0,03; 0,11; 0,21			
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,02; 0,22; 0,27	3	6	4
	bromado	0,02; 0,05; 0,15; 0,29; 0,41; 0,49			
<i>J. virginiana</i>	testigo	0,03	1	1	0
	bromado	0,03			
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0,03; 0,16	2	3	1
	bromado	0,03; 0,16; 0,62			
<i>A. dracunculus</i>	testigo	0,02; 0,07	2	1	0
	bromado	0,07			
<i>F. vulgare</i>	testigo		0	2	2
	bromado	0,01; 0,09			
<i>C. aurantifolia</i>	testigo	0,03; 0,15	2	0	0
	bromado				
<i>L. cubeba</i>	testigo	0,01	1	0	0
	bromado				
<i>M. arvensis</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,01, 0,22; 0,37			
<i>M. viridiflora</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,01			

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos “nuevos”
<i>M. fragrans</i>	testigo	0,01; 0,05; 0,17; 0,35	4	5	1
	bromado	0,01; 0,05; 0,17; 0,26; 0,35			
<i>O. vulgare</i>	testigo	0,06; 0,29	2	5	3
	bromado	0,04; 0,29; 0,36; 0,44; 0,49			
<i>P. cablin</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0			
<i>P. sylvestris</i>	testigo	0,14	1	2	1
	bromado	0; 0,15			
<i>S. officinalis</i>	testigo	0,22	1	3	2
	bromado	0,22; 0,38; 0,49			
<i>C. odorata</i>	testigo	0,15	1	1	0
	bromado	0,15			
<i>C. cassia</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0			
Número total de halos de captadores de radical superóxido			27	47	26

Los resultados indican que, en distinta proporción, la reacción afecta a las propiedades antioxidantes de las mezclas en ambos ensayos. Para el radical DPPH, los aceites esenciales no modificados poseen un mayor número de halos de captación que para el caso del superóxido. Sin embargo en ambos casos el número de halos se incrementa luego de la reacción (**Figura 45**).



**Figura 45.** Gráfico de barras comparativo de halos de captadores de DPPH y de Superóxido obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Cabe remarcar que en el caso de captación de DPPH, 35 de los 65 halos observados en las mezclas bromadas (54 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida. Si, a los efectos de simplificar el cálculo, se asume que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida, el número total de captadores de DPPH creció de 51 a 86, lo que implica un incremento del 69 %. Similarmente, 26 de los 47 halos de captación de superóxido observados en las mezclas bromadas (55 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida. Esto indica que el número total de captadores de superóxido creció de 27 a 53, lo que implica un incremento del 96 % (asumiendo nuevamente que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida). Sin embargo, es probable que estos números sean inferiores debido a la presencia de componentes que están presentes en más de uno de los aceites esenciales utilizados y que al ser modificados producen los mismos compuestos bromados captadores de DPPH o de superóxido.

### 3.2.7.2 Detección de inhibidores enzimáticos

#### 3.2.7.2.1 Actividad inhibitoria de la enzima $\beta$ -Glucosidasa

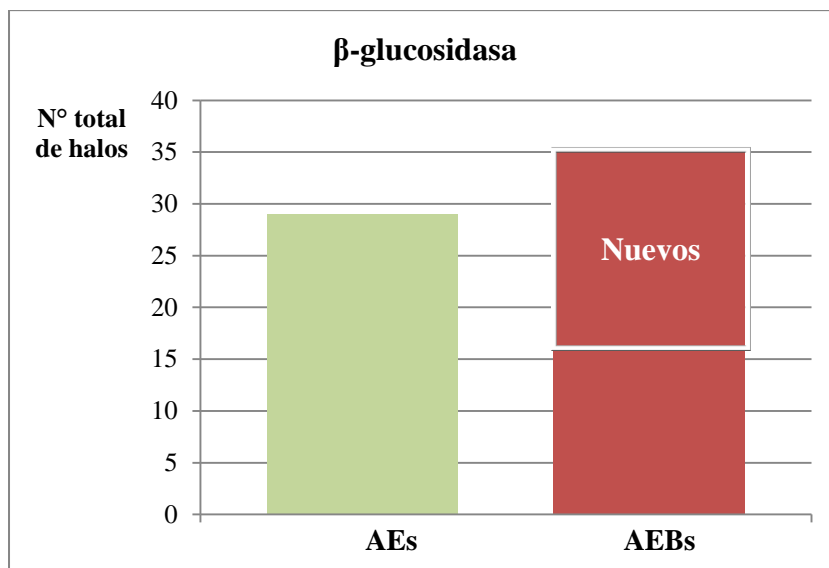
En la **Tabla 14** se resumen los halos de inhibición observados para este conjunto de AEs, mostrándose solamente aquellos que han presentado al menos un halo de inhibición para el aceite esencial natural o modificado.

**Tabla 14.** Resumen de halos de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos “nuevos”
<i>P. racemosa</i>	testigo	0; 0,22	2	3	2
	bromado	0,14; 0,22; 0,66			
<i>C. bergamia</i>	testigo	0,133	1	0	0
	bromado				
<i>C. verum</i>	testigo	0,27	1	2	2
	bromado	0,03; 0,19			
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,11	1	2	1
	bromado	0,11; 0,22			
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0,19	1	1	1
	bromado	0,66			
<i>C. sativum</i>	testigo	0,19	1	1	0
	bromado	0,19			
<i>J. communis</i>	testigo	0; 0,05; 0,16	3	3	0
	bromado	0; 0,05; 0,16			

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>A. dracunculus</i>	testigo	0; 0,05; 0,16	3	0	0
	bromado				
<i>E. globulus</i>	testigo	0; 0,16; 0,22	3	3	1
	bromado	0,16; 0,22; 0,66			
<i>F. vulgare</i>	testigo	0,55	1	2	2
	bromado	0; 0,16			
<i>L. angustifolia</i>	testigo	0 ; 0,55	2	3	1
	bromado	0; 0,55; 0,60			
<i>C. Citratus</i>	testigo	0,27	1	0	0
	bromado				
<i>C. limonum</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,55			
<i>L. cubeba</i>	testigo	0,06; 0,34	2	1	1
	bromado	0,56			
<i>M. arvensis</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,41			
<i>M. viridiflora</i>	testigo	0,24	1	1	1
	bromado	0,17			
<i>M. fragrans</i>	testigo	0,22	1	3	2
	bromado	0; 0,22; 0,56			
<i>O. vulgare</i>	testigo	0,27	1	1	0
	bromado	0,27			
<i>S. officinalis</i>	testigo	0,22	1	3	2
	bromado	0,22; 0,46; 0,53			
<i>V. zizaniodes</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,53			
<i>C. odorata</i>	testigo	0,18	1	1	0
	bromado	0,18			
<i>C. cassia</i>	testigo	0; 0,35	2	2	0
	bromado	0; 0,35			
Número total de halos de inhibición enzima $\beta$ -glucosidasa			29	35	19

Como se puede observar se presentan un mayor número de halos de inhibición para esta actividad luego de la reacción de bromación. Para esta actividad inhibitoria, 19 de los 35 halos de inhibición observados en las mezclas bromadas (54 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida (**Figura 46**). Por otra parte, si asumimos que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida, esto indica que el número total de captadores creció de 29 a 48, lo que implica un incremento del 65 %.



**Figura 46.** Gráfico de barras comparativo de halos de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

### 3.2.7.2.2 Actividad inhibitoria de la enzima Acetilcolinesterasa

En la **Tabla 15** se resumen los halos de inhibición observados para este conjunto de AEs.

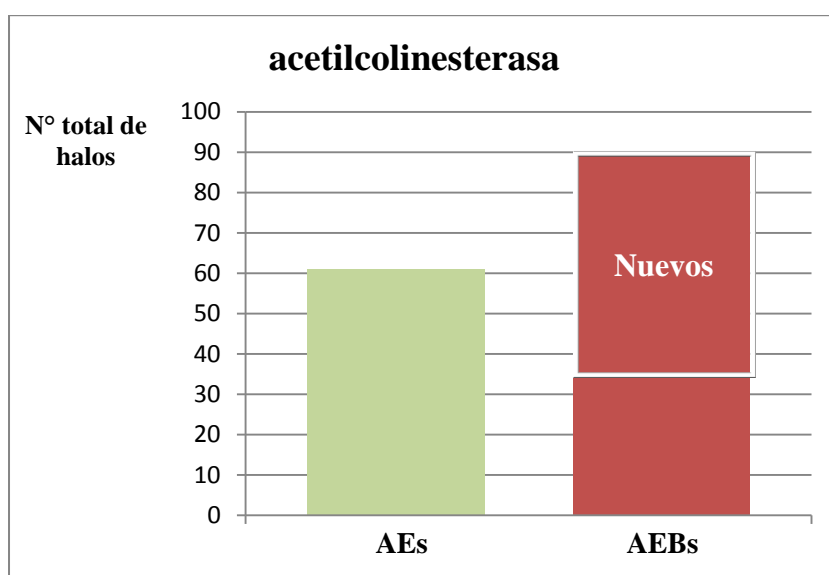
**Tabla 15.** Resumen de halos de inhibición de acetilcolinesterasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	Nº halos AEs	Nº halos AEBs	Nº halos "nuevos"
<i>A. alba</i>	testigo	0,12; 0,45	2	3	1
	bromado	0,12; 0,45 ; 0,56			
<i>A. absinthium</i>	testigo	0,10; 0,18; 0,45	3	0	0
	bromado				
<i>A. sativum</i>	testigo	0,50	1	0	0
	bromado				
<i>O. basilicum</i>	testigo	0,26; 0,52	2	2	2
	bromado	0,15; 0,37			
<i>C. aurantium</i>	testigo	0,15; 0,38	2	4	4
	bromado	0,02; 0,09; 0,47; 0,55			
<i>P. racemosa</i>	testigo	0,03; 0,24	2	2	1
	bromado	0,03; 0,09			
<i>C. bergamia</i>	testigo	0,24; 0,46	2	3	3
	bromado	0,07; 0,17 ; 0,56			
<i>C. verum</i>	testigo	0,24	1	3	3
	bromado	0,02; 0,07; 0,31			

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( <i>Rf</i> ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,02; 0,10; 0,19; 0,44	4	3	1
	bromado	0,10; 0,19; 0,29			
<i>J. virginiana</i>	testigo	0,11; 0,26; 0,40	3	4	2
	bromado	0,18; 0,26; 0,28; 0,40			
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0,17; 0,42	2	3	3
	bromado	0,07; 0,25; 0,57			
<i>C. sativum</i>	testigo	0,18; 0,28	2	2	0
	bromado	0,18; 0,28			
<i>J. communis</i>	testigo		0	1	
	bromado	0,59			
<i>A. dracuncululus</i>	testigo	0,65	1	3	3
	bromado	0,30; 0,40; 0,49			
<i>E. globulus</i>	testigo	0,11; 0,40	2	2	1
	bromado	0,11; 0,54			
<i>F. vulgare</i>	testigo	0,51	1	3	3
	bromado	0,22; 0,42; 0,60			
<i>L. angustifolia</i>	testigo	0,03; 0,10 ; 0,16; 0,22; 0,50	5	8	3
	bromado	0,03; 0,10 ; 0,16; 0,22; 0,31; 0,40; 0,50; 0,57			
<i>C. citratus</i>	testigo	0,10; 0,31	2	1	1
	bromado	0,31			
<i>C. aurantifolia</i>	testigo	0,15; 0,44	2	2	1
	bromado	0,15; 0,59			
<i>C. limonum</i>	testigo	0,26; 0,40	2	6	6
	bromado	0,02; 0,11; 0,20; 0,48; 0,58; 0,66			
<i>L. cubeba</i>	testigo	0,28	1	1	1
	bromado	0,57			
<i>M. arvensis</i>	testigo	0,20; 0,28; 0,37; 0,46	4	5	1
	bromado	0,20; 0,28; 0,37; 0,46; 0,57			
<i>M. viridiflora</i>	testigo	0,03; 0,18; 0,41	3	4	1
	bromado	0,03; 0,18; 0,41; 0,57			
<i>M. fragrans</i>	testigo	0,13; 0,23; 0,37	3	7	4
	bromado	0,06; 0,13; 0,23; 0,37; 0,44; 0,51; 0,58			
<i>C. martinii</i>	testigo	0,13; 0,45	2	3	2
	bromado	0,06; 0,13; 0,38			
<i>P. cablin</i>	testigo	0,18; 0,30	2	2	1
	bromado	0,12; 0,18			
<i>P. sylvestris</i>	testigo	0,15	1	3	2
	bromado	0; 0,15; 0,62			
<i>S. officinalis</i>	testigo	0,43	1	2	2
	bromado	0,30; 0,57			
<i>V. zizaniodes</i>	testigo	0,35	1	1	0

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	Nº halos AEs	Nº halos AEBs	Nº halos "nuevos"
	bromado	0,35			
<i>C. odorata</i>	testigo	0,35	1	1	0
	bromado	0,35			
<i>C. cassia</i>	testigo	0,19	1	5	4
	bromado	0; 0,17; 0,14; 0,19; 0,21			
Número total de halos de inhibición enzima acetilcolinesterasa			61	89	56

Como se puede observar se presentan un mayor número de halos de inhibición para esta actividad luego de la reacción de bromación. Estos resultados son graficados en la **Figura 47**.



**Figura 47.** Gráfico de barras comparativo de halos de inhibición acetilcolinesterasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Cabe remarcar que 56 de los 89 halos de inhibición observados en las mezclas bromadas (63 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida. Si, nuevamente, asumimos que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida, esto indica que el número total de captadores creció de 61 a 117, lo que implica un incremento del 92 %.

### 3.2.7.2.3 Actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa

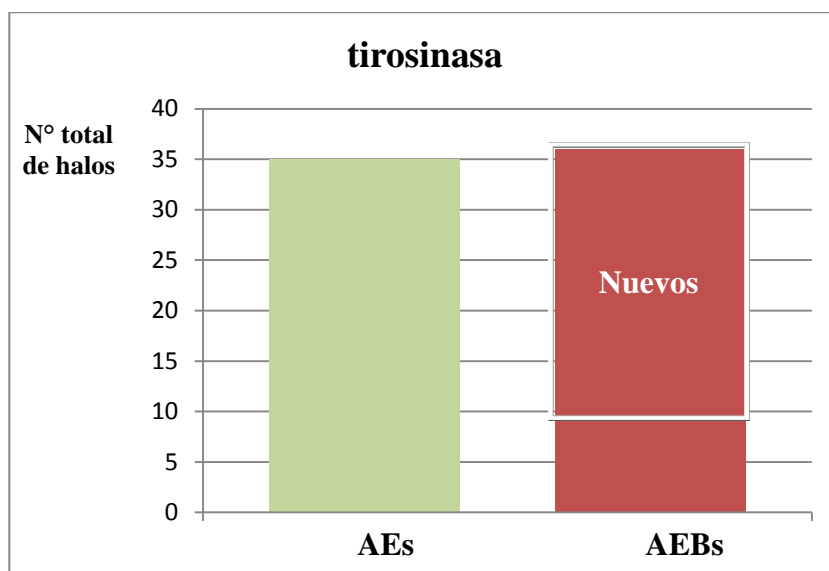
En la **Tabla 16** se resumen los halos de inhibición observados para este conjunto de AEs.

**Tabla 16.** Resumen de halos de inhibición de tirosinasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( <i>Rf</i> ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos “nuevos”
<i>A. alba</i>	testigo	0,03; 0,20	2	1	1
	bromado	0,55			
<i>A. absinthium</i>	testigo	0,03	1	1	1
	bromado	0,55			
<i>A. sativum</i>	testigo	0,55	1	2	2
	bromado	0,42; 0,48			
<i>O. basilicum</i>	testigo	0,08; 0,50	2	5	4
	bromado	0,08; 0,20; 0,24; 0,42; 0,50			
<i>C. aurantium</i>	testigo	0,20; 0,66	2	0	0
	bromado				
<i>P. racemosa</i>	testigo	0,17; 0,27	2	2	1
	bromado	0,17, 0,23			
<i>C. bergamia</i>	testigo	0,31	1	2	2
	bromado	0,54; 0,62			
<i>C. verum</i>	testigo	0,22; 0,34 ; 0,52	3	3	1
	bromado	0,04; 0,22; 0,34			
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,06	1	1	1
	bromado	0,22			
<i>J. virginiana</i>	testigo	0,33; 0,67	2	0	
	bromado				
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0,04; 0,15; 0,24	3	2	2
	bromado	0,48; 0,58			
<i>C. sativum</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,56			
<i>A. dracunculus</i>	testigo	0; 0,05; 0,55	3	4	1
	bromado	0; 0,05; 0,22; 0,55			
<i>E. globulus</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,55			
<i>F. vulgare</i>	testigo	0,16; 0,55	2	3	2
	bromado	0,138; 0,25; 0,55			
<i>C. Citratus</i>	testigo	0,06; 0,27	2	0	0
	bromado				
<i>L. cubeba</i>	testigo	0,08; 0,32	2	0	0
	bromado				
<i>M. fragrans</i>	testigo	0,22	1	2	2
	bromado	0,57; 0,64			
<i>O. vulgare</i>	testigo	0,25	1	0	0
	bromado				
<i>P. sylvestris</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,06; 0,52; 0,61			

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>S. officinalis</i>	testigo		0	1	1
	bromado	0,25			
<i>C. odorata</i>	testigo	0,30	1	0	0
	bromado				
<i>C. cassia</i>	testigo	0,03; 0,22; 0,30	3	2	1
	bromado	0; 0,22			
Número total de halos de inhibición enzima tirosinasa			35	36	27

Como se puede observar no se presentan un mayor número de halos de inhibición para la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa luego de la reacción de bromación. Estos resultados son graficados en la **Figura 48**.



**Figura 48.** Gráfico de barras comparativo de halos de inhibidores de tirosinasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Sin embargo, 27 de los 36 halos de inhibición observados en las mezclas bromadas (75 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida, lo que implica que de igual manera se generaron cambios en las propiedades biomoleculares de estas mezclas debido a la reacción de bromación. Si asumimos que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida, esto indica que el número total de inhibidores creció de 35 a 62, indicando un incremento del 77 %.

### 3.2.7.2.4 Actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa

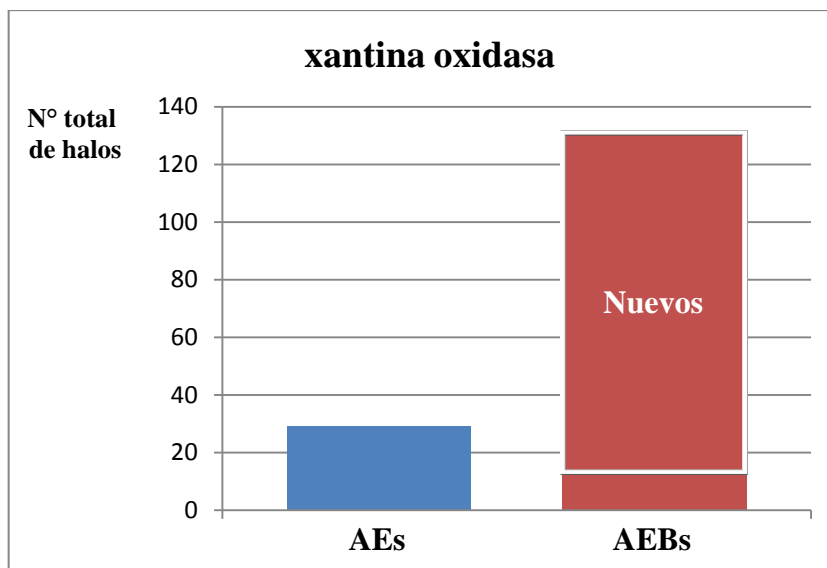
En la **Tabla 17** se resumen los halos de inhibición observados para este conjunto de AEs, se mostrándose solamente aquellos que han presentado al menos un halo de inhibición para el aceite esencial natural o modificado. Como fuera mencionado en la (**Sección 1.5.2**), el ensayo autográfico de XO detecta la actividad enzimática sobre placa midiendo la producción de superóxido, por lo tanto aquellos compuestos que son captadores de superóxido, producirán un halo a pesar de no ser inhibidores de la enzima. Por lo tanto, para evitar contar falsos positivos, se consideraron como halos de inhibición de XO solamente aquellos halos presentes en esta autografía enzimática y además ausentes en la autografía de antioxidantes captadores de superóxido.

**Tabla 17.** Resumen de halos de inhibición de xantina oxidasa obtenidos para aceites esenciales (AEs) nativos y modificados mediante la reacción de bromación en solución.

Especie vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( $R_f$ ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos "nuevos"
<i>A. alba</i>	testigo	0,41	1	7	6
	bromado	0; 0,10; 0,16; 0,32; 0,41; 0,50; 0,56			
<i>A. absinthium</i>	testigo		0	6	6
	bromado	0,08; 0,15; 0,33; 0,44; 0,50; 0,58			
<i>A. sativum</i>	testigo	0,02; 0,08	2	2	2
	bromado	0,51; 0,61			
<i>O. basilicum</i>	testigo		0	4	4
	bromado	0,03; 0,11; 0,18; 0,60			
<i>C. aurantium</i>	testigo		0	8	8
	bromado	0,02; 0,09; 0,15; 0,20; 0,25; 0,31; 0,44; 0,54			
<i>C. bergamia</i>	testigo	0,02; 0,38	2	8	7
	bromado	0,02; 0,09; 0,15; 0,19; 0,26; 0,35; 0,49; 0,55			
<i>C. verum</i>	testigo	0; 0,39; 0,47; 0,55	3	2	2
	bromado	0,33; 0,49			
<i>Cedrus sp</i>	testigo	0,57	1	0	0
	bromado				
<i>J. virginiana</i>	testigo	0,56	1	3	3
	bromado	0,07; 0,15; 0,33			
<i>C. sempervirens</i>	testigo	0	1	6	6
	bromado	0,09; 0,20; 0,25; 0,33; 0,46; 0,56			
<i>C. sativum</i>	testigo	0,03; 0,53; 0,58	3	6	4
	bromado	0,03; 0,09; 0,15; 0,29; 0,35; 0,58			
<i>J. communis</i>	testigo	0,02; 0,58	2	6	4
	bromado	0,02; 0,09; 0,14; 0,20; 0,50; 0,58			
<i>A. dracunculus</i>	testigo	0,24; 0,32; 0,55	3	6	3
	bromado	0,14; 0,24; 0,32; 0,43; 0,49; 0,55			
<i>E. globulus</i>	testigo	0,02	2	7	6
	bromado	0,02; 0,08; 0,14; 0,22; 0,31; 0,48; 0,57			
<i>F. vulgare</i>	testigo	0,02; 0,16; 0,19; 0,33	4	4	2

Espece vegetal	Aceite esencial	Relación de Frente ( <i>Rf</i> ) de halos de inhibición	N° halos AEs	N° halos AEBs	N° halos “nuevos”
	bromado	0,16; 0,25; 0,33; 0,56			
<i>L. angustifolia</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,06; 0,14; 0,63			
<i>C. aurantifolia</i>	testigo		0	7	7
	bromado	0,01; 0,08; 0,15; 0,22; 0,31; 0,48; 0,55			
<i>C. limonum</i>	testigo		0	5	5
	bromado	0,01; 0,08; 0,14; 0,47; 0,55			
<i>L. cubeba</i>	testigo		0	5	5
	bromado	0,07; 0,12; 0,17; 0,44; 0,55			
<i>M. arvensis</i>	testigo		0	3	3
	bromado	0,07; 0,48; 0,55			
<i>M. viridiflora</i>	testigo		0	6	6
	bromado	0,02; 0,08 ; 0,17; 0,28; 0,45; 0,55			
<i>M. fragrans</i>	testigo		0	2	2
	bromado	0,45; 0,55			
<i>O. vulgare</i>	testigo		0	2	2
	bromado	0,09; 0,14			
<i>C. martinii</i>	testigo		0	4	4
	bromado	0,02; 0,07; 0,12; 0,30			
<i>P. sylvestris</i>	testigo		0	5	5
	bromado	0,09; 0,21; 0,30; 0,48; 0,55			
<i>S. officinalis</i>	testigo		0	4	4
	bromado	0,07; 0,12; 0,49; 0,58			
<i>V. zizaniodes</i>	testigo	0,04	1	4	3
	bromado	0,04; 0,14; 0,18; 0,59			
<i>C. odorata</i>	testigo	0,03	1	3	3
	bromado	0;0,48; 0,60			
<i>C. cassia</i>	testigo	0,15; 0,21	2	4	3
	bromado	0; 0,21; 0,37; 0,48			
Número total de halos de inhibición para enzima xantina oxidasa			29	132	118

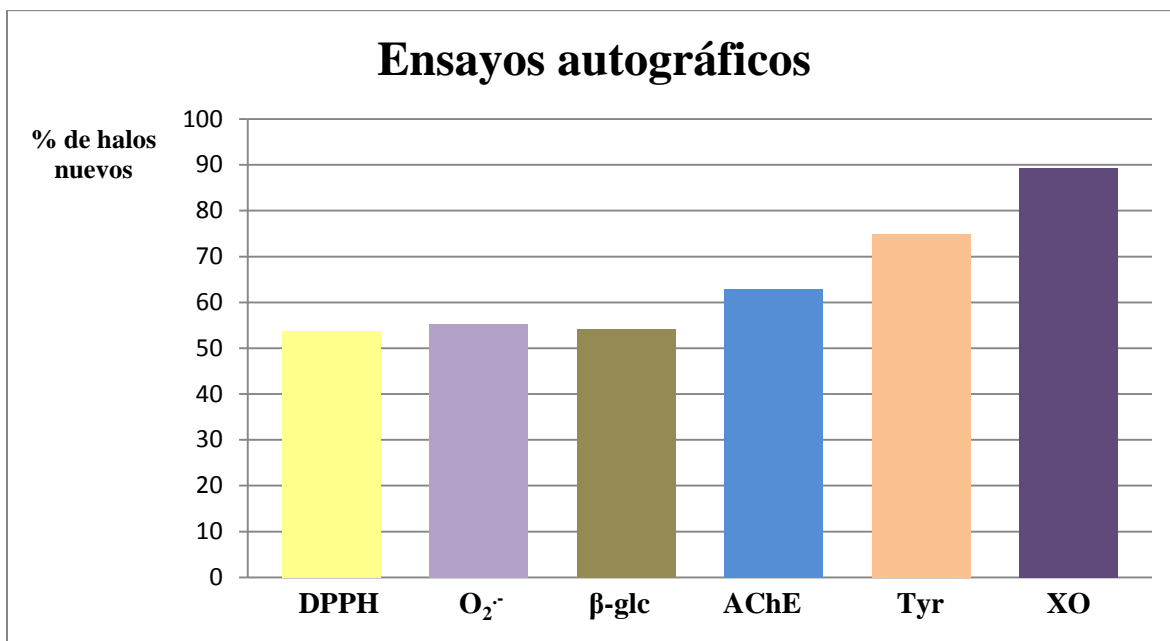
Como se puede observar se presenta un mayor número de halos de inhibición para esta actividad luego de la reacción de bromación (**Figura 49**). Estos resultados muestran el alto impacto global que produce la reacción de bromación en las propiedades inhibitorias de la enzima XO de este grupo de aceites esenciales.



**Figura 49.** Gráfico de barras comparativo de halos de inhibición xantina oxidasa obtenidos para aceites esenciales naturales (AEs) y modificados mediante la reacción de bromación (AEBs).

Cabe remarcar que 118 de los 132 halos de inhibición observados en las mezclas bromadas (89 %) no estaban presentes en los aceites esenciales de partida. Si asumimos que no hay repetición de componentes entre las diferentes mezclas de partida, esto indica que el número total de inhibidores creció de 29 a 147, lo que implica un incremento del 407 %.

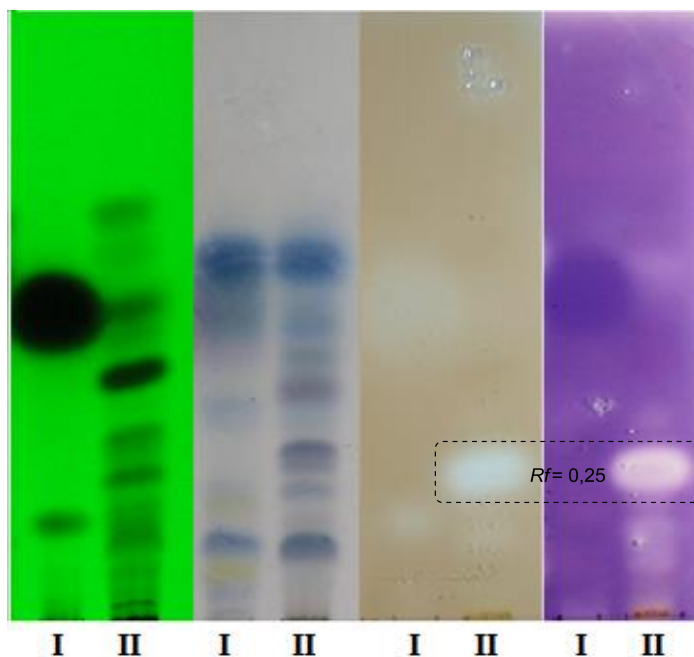
La evaluación a través de ensayos autográficos mostró que la reacción produce cambios interesantes en las propiedades biológicas generando un número significativo de halos de inhibición (ausentes en los AEs de partida). Dependiendo de la actividad biológica evaluada, entre el 54 % y el 89 % del total de halos observados en los AEs bromados fueron resultantes de la reacción (**Figura 50**). El mayor impacto en las propiedades biológicas de estas mezclas fue observado para la actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa, donde el porcentaje de nuevos activos es mayor al 80 %.



**Figura 50.** Porcentaje de halos nuevos generados por la reacción de bromación para la actividad captadora de 2,2-di (4-tert-octilfenil)-1-picril-hidrazilo (DPPH) y superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>); y para la actividad inhibitoria de las enzimas β-glucosidasa (β-glc), acetilcolinesterasa(AChE), tirosinasa (Tyr) y xantina oxidasa (XO).

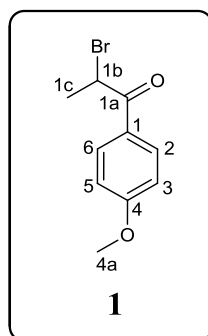
### 3.2.8 Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de *Foeniculum vulgare* Mill.

En la **Sección 3.2.7**, se muestra el alto impacto global que produce la reacción de bromación en solución en las propiedades biomoleculares de este grupo de AEs. El AEB de *Foeniculum vulgare* Mill presentó uno de los halos más interesantes en los ensayos de actividad inhibitoria de las enzimas tirosinasa y xantina oxidasa (**Figura 51**), por lo cual se decidió realizar su fraccionamiento bioguiado.



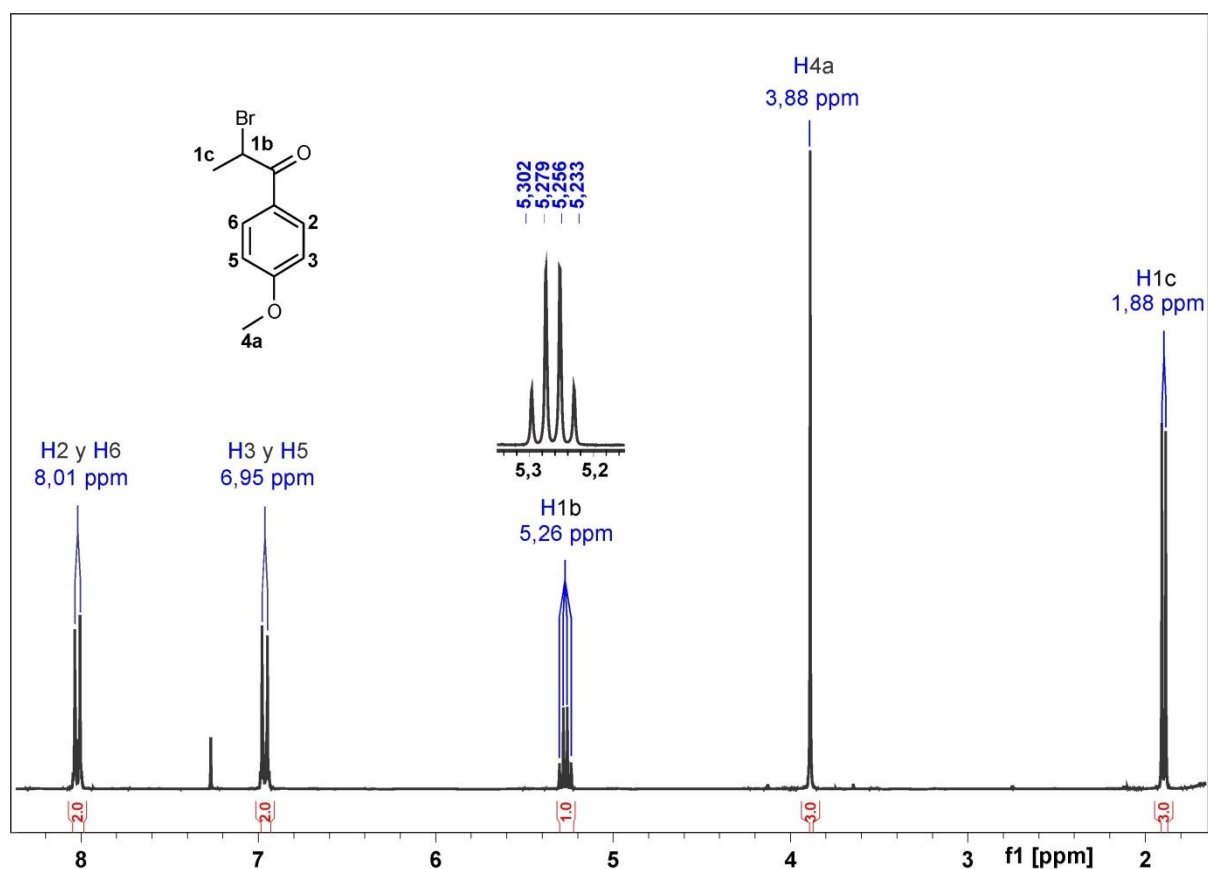
**Figura 51.** CCD del AE (I) y del AEB (II) de *F. vulgare* desarrollada en sistema de solvente hexano:AcOEt (9:1). (a) Revelado bajo luz UV<sub>254</sub> nm, (b) vainillina sulfúrico, (c) autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa y (c) autografía para la detección de inhibidores de xantina oxidasa.

El AEB de *F. vulgare* se sometió a cromatografía en columna (CC) sobre sílica gel eluyendo con gradiente de hexano:AcOEt, desde hexano hasta hexano:AcOEt 90:10. Se realizó el seguimiento de las fracciones activas mediante autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa, por ser de los dos el ensayo más sencillo y rápido. Se obtuvieron 14 fracciones (F1-F14), resultando activa la fracción F8 (12,5 mg) que por CCD mostró solamente la presencia del 2-bromo-1-(4-metoxifenil)propan-1-ona (**1**, **Figura 52**). La elucidación estructural del compuesto **1** se realizó utilizando como herramientas EMAR, CG-EM, RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y de correlación homo y heteronuclear como correlación espectroscópica <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY, del inglés *Correlation Spectroscopy*), correlación heteronuclear cuántica simple <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C con mejora sin distorsión por transferencia de polarización (HSQC-DEPT, del inglés *Heteronuclear Single Quantum Correlation-Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) y correlación heteronuclear a varios enlaces <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMBC, del inglés *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).



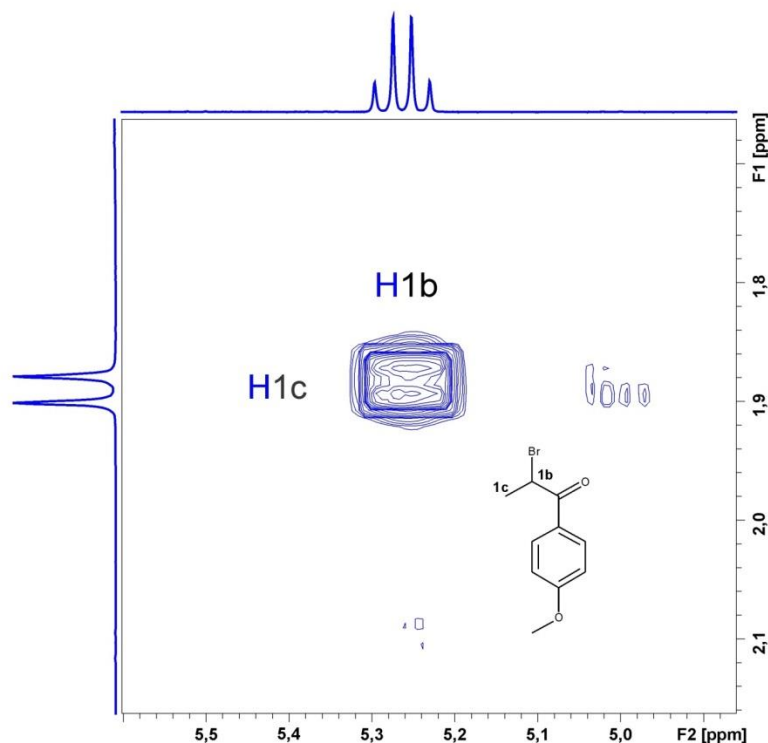
**Figura 52.** Compuesto **1** aislado del AEB de *F. vulgare*.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **1** (**Figura 53**) presentó una integración total para 11 H, a campos bajos mostró la presencia de dos dobletes uno en  $\delta_{\text{H}}$  8,01 ppm ( $J= 8$  Hz) y otro en  $\delta_{\text{H}}$  6,95 ppm ( $J= 8$  Hz) que integraron para 2H cada uno. Por las señales características, estos 4H pertenecen a un anillo aromático sustituido en posición *para*. Se evidenció la presencia de un singlete en  $\delta_{\text{H}}$  3,88 ppm con integración para 3H, correspondiente a un metoxilo aromático.



**Figura 53.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 1,6 ppm a 8,50 ppm) del compuesto **1** aislado del aceite esencial bromado de *F. vulgare*.

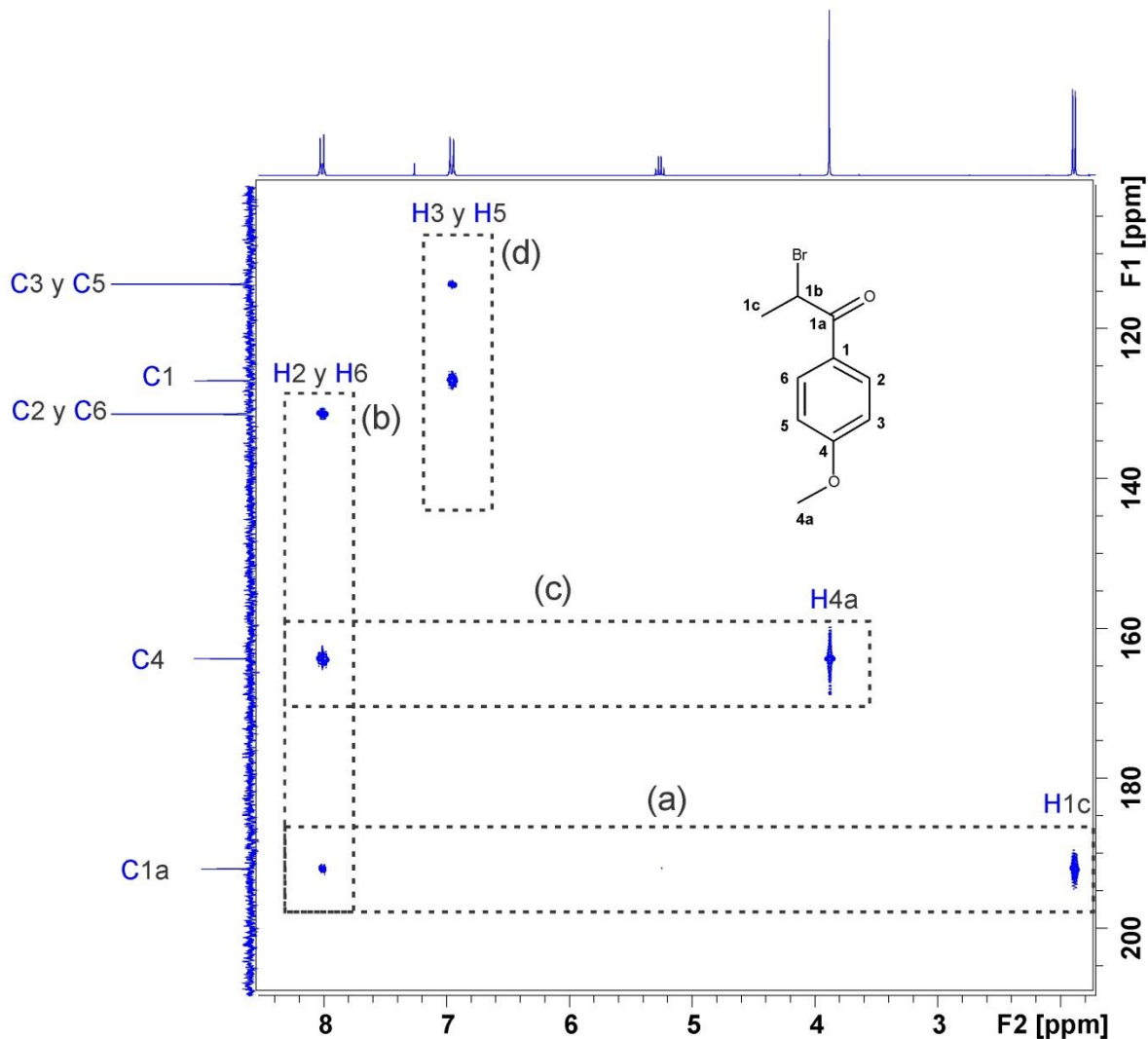
Además, se observó un doblete en  $\delta_{\text{H}}$  1,88 ppm ( $J=7$  Hz) con integración para 3H correspondiente a un metilo y un cuadruplete en  $\delta_{\text{H}}$  5,26 ppm con integración para 1H ( $J=7$  Hz) correspondiente a un grupo -CHBr, que tanto por sus valores de constantes de acoplamiento como por su correlación en  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (**Figura 54**), demostraron ser vecinos



**Figura 54.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ampliado (desde 5,60 a 4,86 ppm para F2 y 2,15 a 1,60 ppm para F1) del compuesto **1** aislado del aceite esencial bromado de *F. vulgare*.

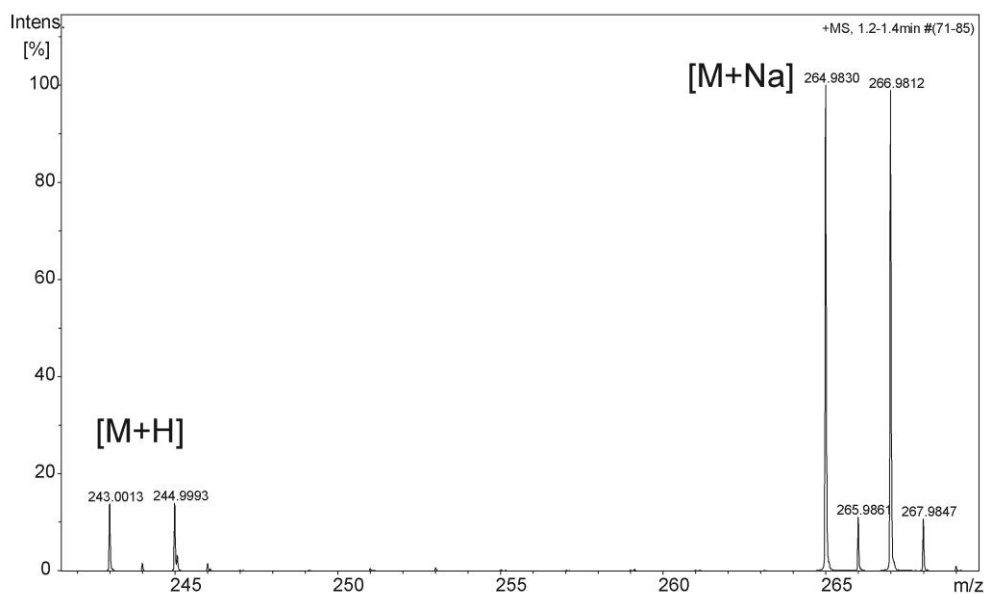
Los espectros de RMN (Anexo I) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 10 C, de los cuales dos corresponden a 2 carbonos cuaternarios aromáticos uno con  $\delta_{\text{C}}$  164,0 ppm (C4) y el otro  $\delta_{\text{C}}$  126,1 ppm (C1) y dos señales ubicadas en 126,1 ppm (C2 y C6) y 114,0 ppm (C3 y C5) corresponden a 4 carbonos del anillo aromático disustituído en *para*. En el experimento HMBC, se observó la señal de un carbono en la zona de desplazamiento correspondiente a carbonos carbonílicos ( $\delta_{\text{C}}=192,0$  ppm, C1a) con correlación a 3 enlaces con los H del grupo metilo ( $\delta_{\text{H}}=1,88$  ppm, H1c) y con los H aromáticos que se presentan a campos más bajos ( $\delta_{\text{H}}=8,00$  ppm, H2 y H6) (**Figura 55a**). Por otra parte, estos últimos protones (**Figura 55b**), presentaron correlación a tres enlaces con los carbonos C2 y C6 (debido que son señales congruentes por la simetría de la molécula) y con la señal correspondiente al carbono aromático de campo más bajo (C4). Además, este último carbono (**Figura 55c**) presentó correlación a 3 enlaces con los protones del grupo metoxilo

(H4a). Por su parte los protones H3 y H5 (**Figura 55d**), presentaron correlación a tres enlaces con el carbono cuaternario C1, además de la correlación a tres enlaces con los carbonos C5 y C3, respectivamente (debido a la simetría de la molécula).



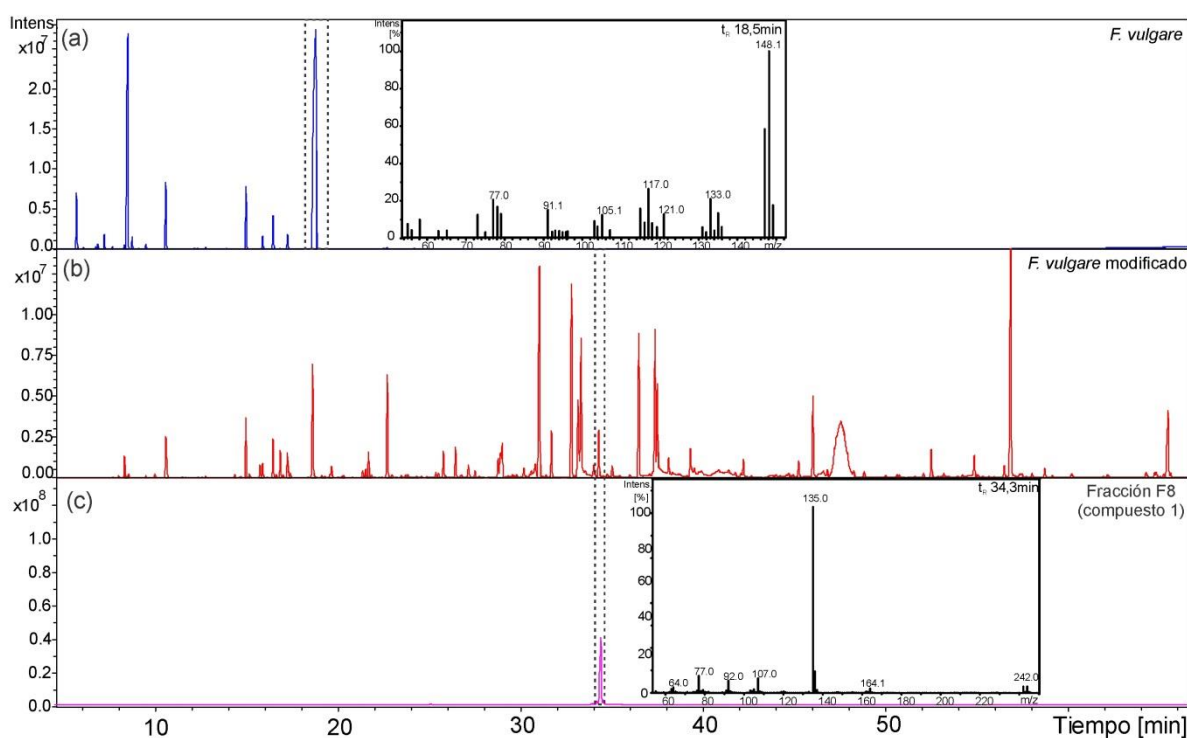
**Figura 55.** Espectro de HMBC ampliado (desde 8,55 a 1,70 ppm para F2 y 200 a 100 ppm para F1) del compuesto **1** aislado del aceite esencial bromado de *F. vulgare*.

Por su parte, el análisis por espectrometría de masa de alta resolución (EMAR) del compuesto **1** (**Figura 56**) muestra señales correspondientes a la molécula protonada [M+H] de  $m/z = 243,0013$  (requerido,  $m/z = 243,0015$ ; error 0,8 ppm) y al aducto [M+Na] de  $m/z = 264,9830$  (requerido  $m/z = 264,9835$ ; error 1,6 ppm) que fueron verificados para la fórmula molecular  $C_{10}H_{11}BrO_2$ , con el correspondiente patrón isotópico característico de compuestos bromados.



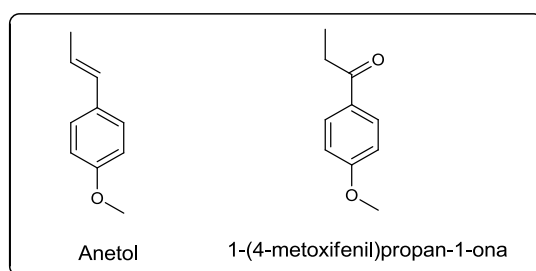
**Figura 56.** Espectro de masa de alta resolución (ampliado 240-270  $m/z$ ) del compuesto **1** aislado del aceite esencial bromado de *F. vulgare*

Una vez aislado el compuesto **1** se corroboró por  $t_R$  y fragmentación por IE (CG-EM), que el mismo estaba presente en un 1,28 % respecto al área de integración total en el aceite esencial bromado de *F. vulgare* (**Figura 57b y c**).



**Figura 57.** Cromatogramas obtenidos mediante CG-EM (a) Aceites esencial de *F. vulgare* (inserto: espectro de masa IE de anetol) (b) Aceite esencial modificado de *F. vulgare* (b) Compuesto **1** obtenido en el fraccionamiento de *F. vulgare* bromado, (inserto: espectro de masa IE de compuesto **1**).

El potencial precursor natural del compuesto activo **1** podría ser el (E)-1-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)benceno (anetol, **Figura 58**). Este compuesto se encuentra presente en el aceite esencial de *F. vulgare* (**Figura 57a**) y su conversión en la  $\alpha$ -bromocetona **1** utilizando diferentes agentes bromantes ha sido reportada.<sup>136, 137</sup> Al realizar la reacción de bromación de anetol en las mismas condiciones utilizadas para la bromación del aceite esencial se obtuvo **1** con un rendimiento del 3,9 %. En vistas de este bajo rendimiento y con la necesidad de obtener más cantidad del compuesto **1** para ensayos biológicos, se decidió sintetizar este compuesto a partir de 1-(4-metoxifenil)propan-1-ona (**Figura 58**) en condiciones reportadas,<sup>138</sup> muy similares a las utilizadas en esta tesis, obteniendo **1** con un 48 % de rendimiento.



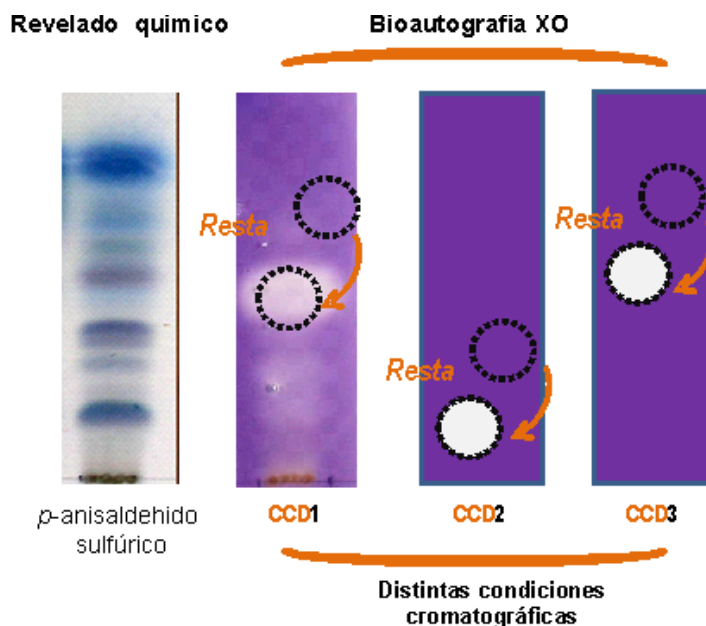
**Figura 58.** Precursores sintéticos de compuesto **1**.

De acuerdo con los análisis autográficos iniciales el compuesto **1** podría ser el responsable de la actividad inhibidora mostrada por el aceite esencial bromado de *F. vulgare* tanto frente a la enzima tirosinasa como frente a la enzima xantina oxidasa (**Figura 51**, página 105). Debido a que el aislamiento del compuesto **1** fue bioguiado en base a la actividad inhibitoria de tirosinasa, para corroborar la identidad del compuesto inhibidor de xantina oxidasa presente en el aceite esencial bromado de *F. vulgare* se aplicó la metodología de bioautografía acoplada a espectrometría de masa para la identificación de compuestos (BIOMSID, del inglés *BIOautography coupled to Mass Spectrometry for the IDentification of compounds*).<sup>132</sup> Esta metodología recientemente reportada por nuestro grupo permite obtener la probable fórmula molecular de un compuesto bioactivo presente en una mezcla compleja conectando un ensayo autográfico con espectrometría de masa de alta resolución.

Esta combinación de CCD-autografía-EMAR suele verse dificultada por la resolución de la cromatografía en capa delgada, sobre todo cuando se analizan mezclas complejas. La baja resolución de este tipo de cromatografía hace que, en general, la zona de la placa correspondiente a un halo de inhibición contenga un número importante de compuestos químicos que incluyen: el o los compuestos activos (responsable/s del halo), otros compuestos

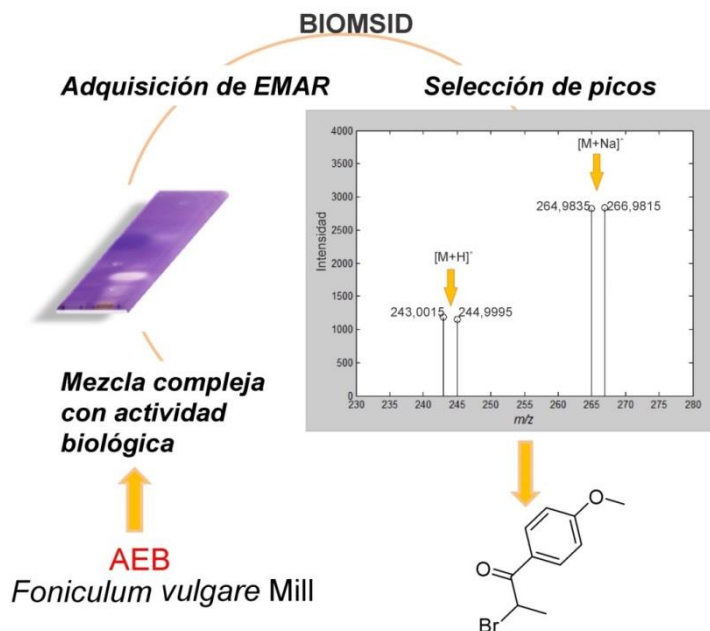
inactivos que coeluyen y reactivos provenientes del ensayo autográfico. La complejidad de los espectros de masa de muestras extraídas de halos de inhibición hace entonces necesario el tratamiento de los espectros a los efectos de identificar cual de los picos presentes es el que pertenece al compuesto activo. Las señales debidas a los reactivos del ensayo pueden filtrarse por comparación con blancos que contienen estos reactivos solamente, sin embargo, no es factible preparar un blanco que permita distinguir las señales pertenecientes al compuesto activo de las señales provenientes de compuestos inactivos que coeluyen. En la estrategia BIOMSID, esta distinción se realiza por comparación de la composición química del halo producido por una determinada mezcla compleja, cuando la bioautografía se realiza luego de desarrollar la placa cromatográfica con diferentes sistemas de solventes. Esta estrategia se basa en que es muy probable que la composición química no vinculada con la bioactividad en un halo de inhibición sea distinta en CCDs de la misma muestra realizadas con distintos sistemas de solventes, es decir que la población de compuestos inactivos que coeluyen con el activo dependerá de las condiciones cromatográficas. Por lo tanto, la comparación programada de espectros de masa permitiría identificar la señal correspondiente al activo. Esta comparación se realiza utilizando un algoritmo escrito en MATLAB que permite la identificación del/los compuesto/s activo/s, ya que revela los iones comunes solamente a todos los espectros provenientes de muestras de halo. Esta estrategia ha sido reportada solamente para la asignación de formulas moleculares de inhibidores conocidos de la enzima acetilcolinesterasa, presentes en extractos naturales, sin embargo, debería ser factible su aplicación a otros ensayos autográficos, como el de xantina oxidasa, y a otro tipos de mezclas, como aceites esenciales bromados.

Se desarrollaron tres CCDs del AEB de *F. vulgare*, con diferentes sistemas de solventes, las cuales fueron reveladas autográficamente para XO (**Figura 59**). De cada placa, se tomaron muestras del gel de agar del halo de inhibición, y de la matriz coloreada. Se adquirieron los espectros respectivos, los que se procesaron con BIOMSID. En una primera etapa, el algoritmo filtró las señales no relacionadas con la composición química del halo (buffer, reactivo revelador, sustrato), luego comparó los espectros filtrados detectando las señales comunes a todos ellos.



**Figura 59.** CCDs del AEB de *F. vulgare*, con diferentes sistemas de solventes reveladas autográficamente para XO.

De esta forma, fue verificada la fórmula molecular correspondiente al compuesto activo,  $C_{10}H_{11}BrO_2$ , en la **Figura 60** pueden observarse los iones moleculares  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$ , con el correspondiente patrón isotópico característico de compuestos bromados. De esta forma, se corroboró que el compuesto responsable de la actividad inhibitoria para ambas enzimas era el mismo.

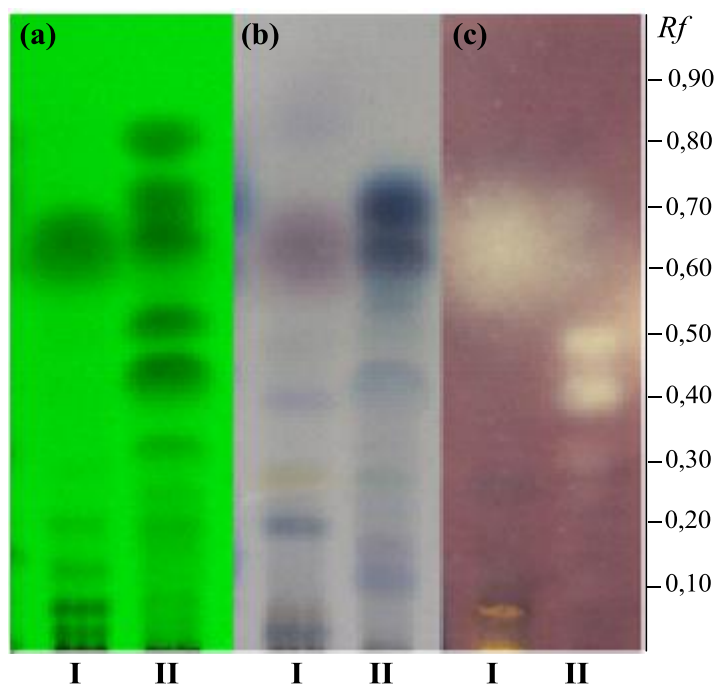


**Figura 60.** Gráfico resumen de la metodología BIOMSID

A fin de cuantificar la actividad inhibitoria de este compuesto frente a las enzimas tirosinasa<sup>139</sup> y xantina oxidasa se realizaron ensayos en microplaca. Con respecto a la actividad inhibitoria de tirosinasa el compuesto **1** presentó una  $CI_{50}$  de 21,40  $\mu\text{M}$ , siendo 1,96 veces más activo que el inhibidor de referencia ácido kójico ( $CI_{50} = 42,16 \mu\text{M}$ ). Con respecto a la actividad inhibitoria de xantina oxidasa el compuesto presentó una  $IC_{50}$  de 5,90  $\mu\text{M}$ , siendo 2,26 veces menos activo que el inhibidor de referencia alopurinol ( $CI_{50} = 2,60 \mu\text{M}$ ).

### 3.2.9 Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de *Artemisia dracunculus* L.

En la **Sección 3.2.7.2.2**, se muestra el alto impacto global que produce la reacción de bromación en solución sobre la actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa de este grupo de AEs. El AEB de *Artemisia dracunculus* L presentó dos halos interesantes en el ensayo de actividad inhibitoria de esta enzima (**Figura 61**), que estaban ausentes en el AE de partida, por lo cual se realizó su fraccionamiento bioguiado.

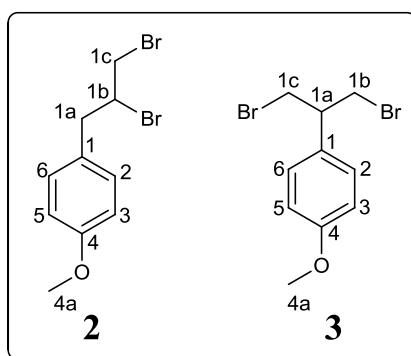


**Figura 61.** CD de AE (I) y AEB (II) de *A. dracunculus* desarrollada en sistema de solvente hexano:AcOEt (9:1). (a) Revelado bajo luz UV  $_{254 \text{ nm}}$ , (b) vainillina sulfúrico, (c) autografía para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa.

Se realizó el aislamiento mediante CC empleando gradiente de hexano:AcOEt y monitoreando la actividad de las fracciones utilizando la autografía para la detección de

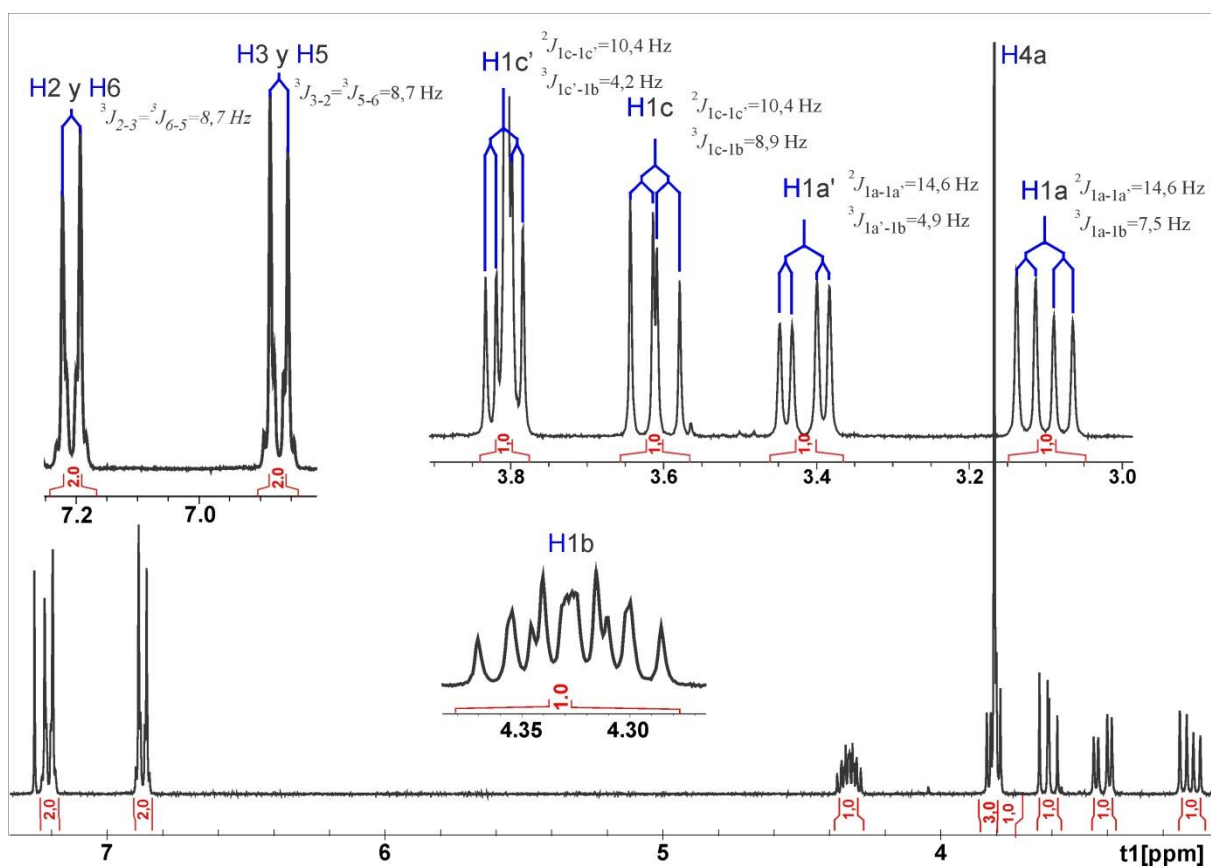
inhibidores de acetilcolinesterasa.<sup>132</sup> Se obtuvieron 10 fracciones (F1-F10), resultando activas las fracciones F3, F4 y F5. En la F3 se observó la presencia del halo de inhibición de mayor  $R_f$  ( $R_f=0,49$ ), en la fracción F5 se observó la presencia del halo de inhibición de menor  $R_f$  ( $R_f=0,40$ ) y en la fracción F4 aparecieron ambos halos de inhibición.

La fracción F3 contiene al compuesto 1-(2,3-dibromopropil)-4-metoxibenzeno (**2**) y la fracción F5 contiene el compuesto 1-(1,3-dibromopropan-2-il)-4-metoxibenzeno (**3**) (**Figura 62**). La elucidación estructural de ambos compuestos fue realizada utilizando como herramientas CG-EM, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y de correlación homo y heteronuclear como  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC (editado DEPT) y HMBC.



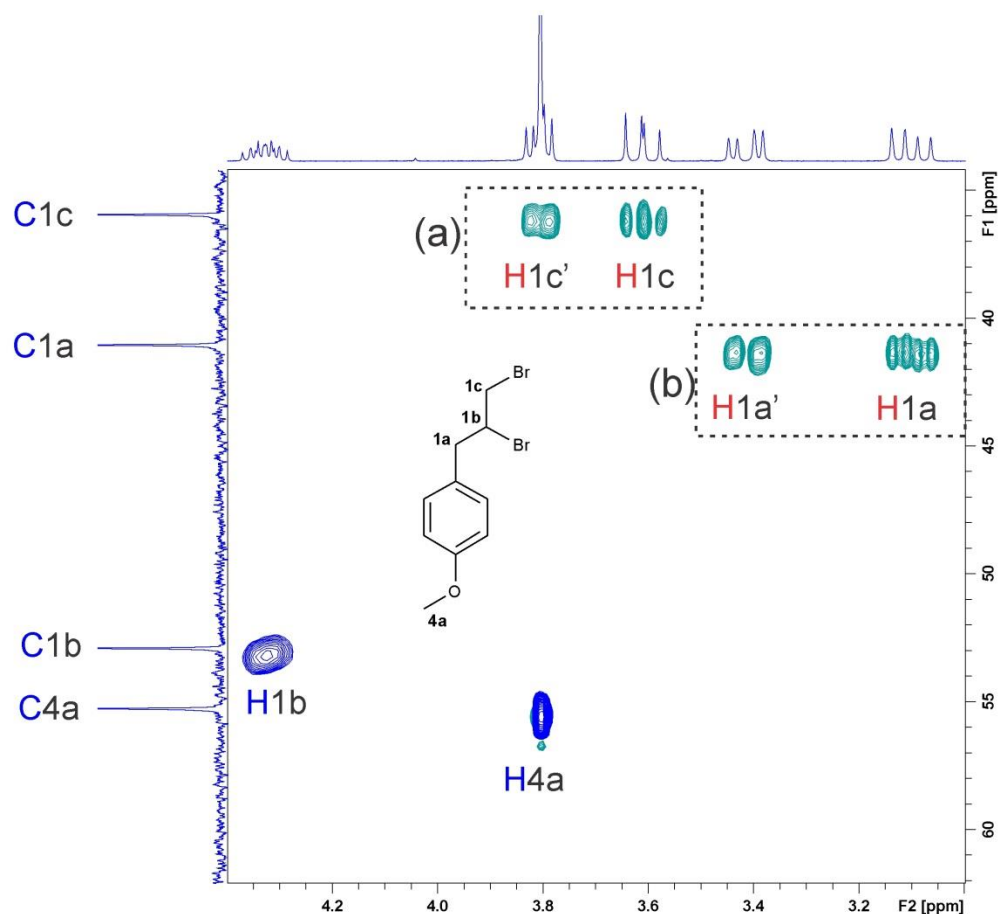
**Figura 62.** Compuestos aislados del AEB de *A. dranculus*.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **2** (**Figura 63**) presentó una integración total para 10 H, a campos bajos mostró la presencia de dos dobletes uno en  $\delta_{\text{H}}$  7,21 ppm ( $J= 8,7$  Hz) y otro en  $\delta_{\text{H}}$  6,87 ppm ( $J= 8,7$  Hz) que integraron para 2H cada uno, ambos pertenecientes al mismo sistema de spins. Estos 4H pertenecen a un anillo aromático sustituido en posición *para*. Debido a la simetría que presenta el anillo, H3 y H5 son equivalentes en desplazamiento químico, como así también lo son los protones H2 y H6. Se evidenció además un singlete en  $\delta_{\text{H}}$  3,81 ppm con integración para 3H, correspondiente a un metoxilo aromático que es uno de los sustituyentes en *para* del anillo aromático.



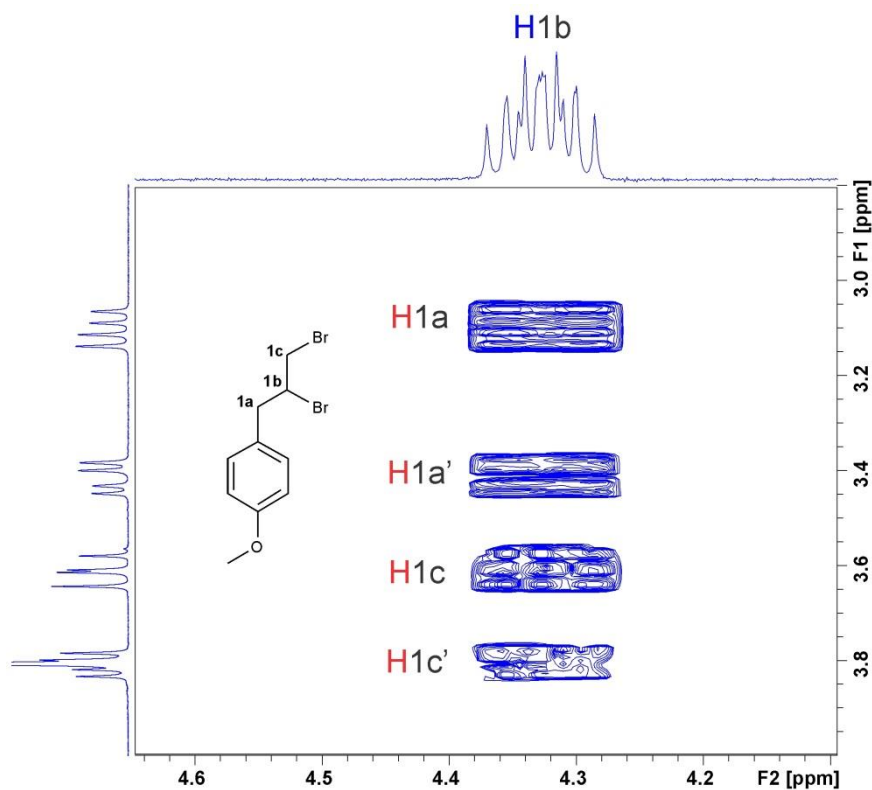
**Figura 63.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 1,6 ppm a 8,50 ppm) del compuesto **2** aislado del AEB de *A. dracunculus*.

En el espectro de HSQC (editado en DEPT) (**Figura 64**) puede observarse que los protones unidos al carbono C1a ( $\delta_c$  41,0 ppm) presentan distintos desplazamientos químicos entre sí (H1a,  $\delta_H$  3,10 y H1a',  $\delta_H$  3,41), es decir son diastereotópicos. Lo mismo sucede con los protones metilénicos (H1c,  $\delta_H$  3,61 ppm y H1c',  $\delta_H$  3,81 ppm) unidos al C1c ( $\delta_c$  35,9 ppm).



**Figura 64.** Espectro de HSQC (editado en DEPT) ampliado (desde 4,40 a 3,00 ppm para F2 y 62 a 100 ppm para F1) del compuesto **2** aislado del AEB de *A. dracuncululus*.

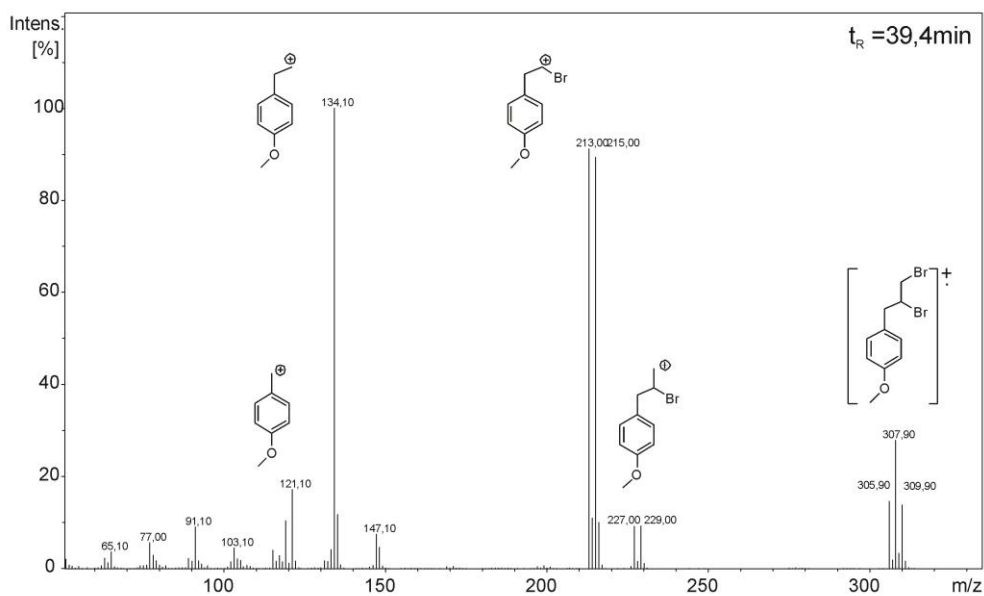
En el espectro de HH COSY (**Figura 65**) muestra que estos protones son vecinos al proton con  $\delta_H$  4,32 ppm (H1b), el cual esta unido a un centro estereogénico (C1b). Siendo diastereotópicos cada uno de ellos presenta además distinta constante de acoplamiento con el protón H1b unido al centro estereogénico. Esto también explica porque la señal del protón H1b aparece como un multiplete.



**Figura 65.** Espectro de HH COSY ampliado (desde 4,6 a 4,10 ppm para F2 y 4,00 a 2,80 ppm para F1) del compuesto **2** aislado del AEB de *A. dracuncululus*.

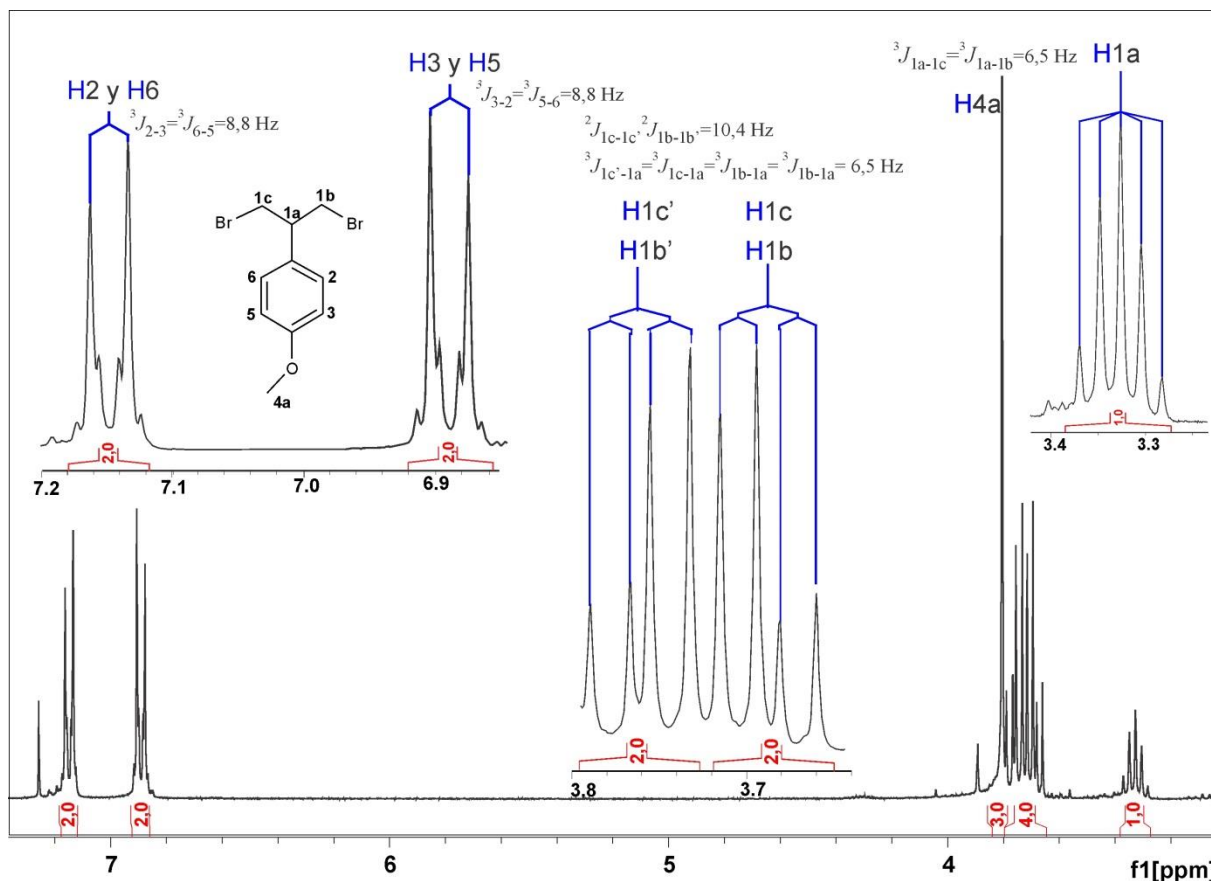
Los espectros de RMN (Anexo II) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 10 C, de los cuales dos correspondían a carbonos cuaternarios aromáticos uno con  $\delta_{\text{C}}$  158,8 ppm (C4) y el otro con  $\delta_{\text{C}}$  128,7 ppm (C1) y dos señales ubicadas en  $\delta_{\text{C}}$  130,6 ppm (C2 y C6) y  $\delta_{\text{C}}$  113,9 ppm (C3 y C5) correspondían a los cuatro carbonos del anillo disustituído en *para*. En el experimento HMBC, se observó correlación a 3 enlaces entre los protones metilénicos H1a y H1a' con los carbonos que aparecen a campos más bajos ( $\delta_{\text{C}}$  130,6 ppm, C 2 y 6).

El compuesto **2** fue sometido a cromatografía gaseosa, donde el único pico obtenido fue coincidente (en  $t_{\text{R}}$  y fragmentación por IE en espectro de masa) con un pico presente en el cromatograma del aceite esencial modificado de *A. dracuncululus*. El pico con  $t_{\text{R}}$  de 39,4 minutos presenta un espectro de masa (**Figura 66**) donde puede observarse el ion molecular de 307,90  $m/z$  y el correspondiente patrón isotópico de un compuesto dibromado.



**Figura 66.** Espectro de masa correspondiente a  $t_R$  de 34,9 minutos del cromatograma gaseoso del compuesto **2**.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **3** (**Figura 67**) también presentó una integración total para 10 H, a campos bajos mostró la presencia de dos dobletes uno en  $\delta_{\text{H}}$  7,15 ppm ( $J = 8,8 \text{ Hz}$ ) y otro en  $\delta_{\text{H}}$  6,89 ppm ( $J = 8,8 \text{ Hz}$ ) que integraron para 2H cada uno. Por las señales características, estos 4H pertenecen a un anillo aromático sustituido en posición *para*. Esto es debido a la simetría que presenta el anillo, H3 y H5 son equivalentes en desplazamiento químico, como así también lo son los protones H2 y H6. Se evidenció además un singlete en  $\delta_{\text{H}}$  3,80 ppm con integración para 3H, correspondiente a un metoxilo aromático.

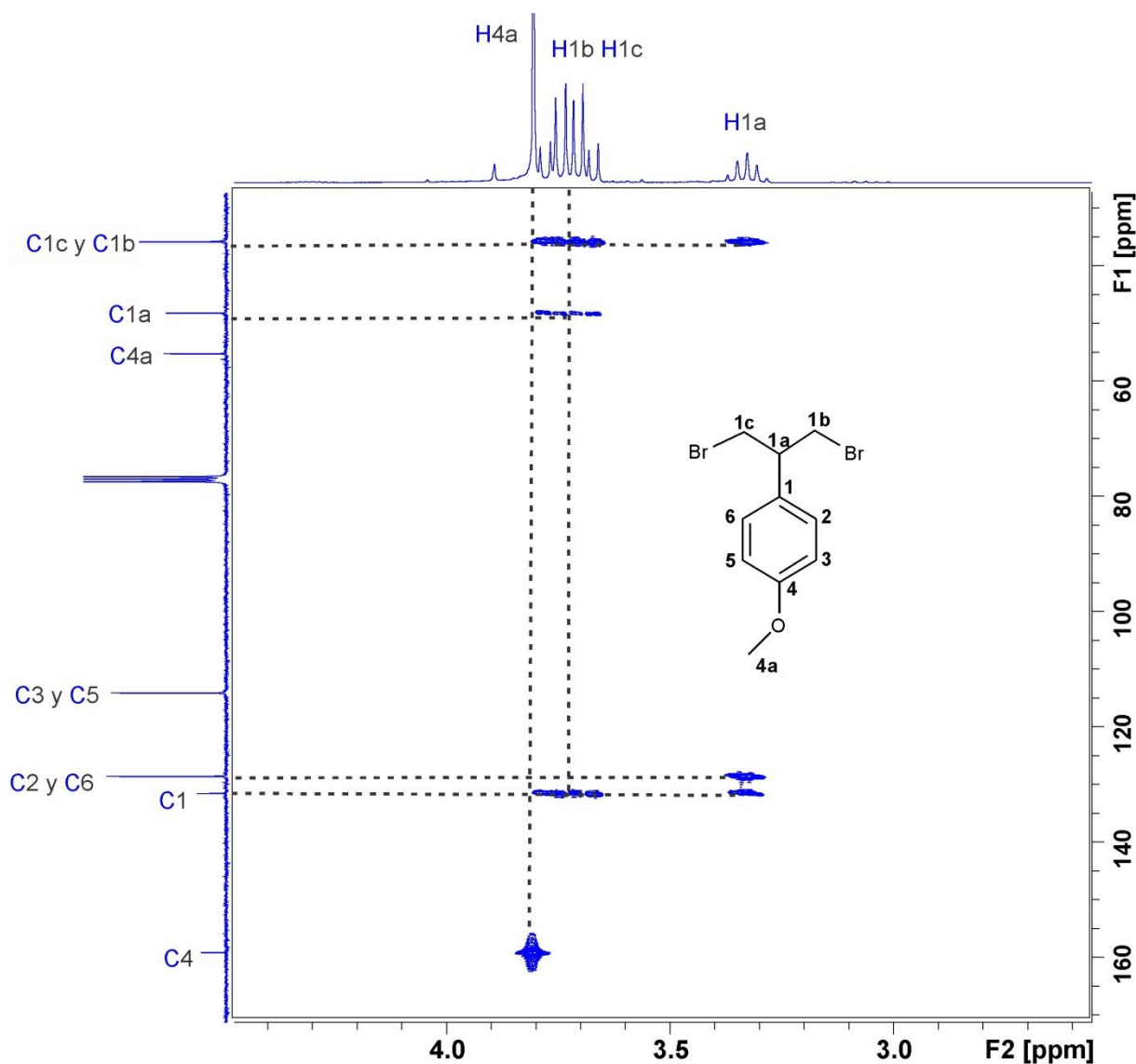


**Figura 67.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 7,30 ppm a 3 ppm) del compuesto **3** aislado del AEB de *A. dracunculus*.

Debido a la simetría de la molécula, se presentan dos grupos metilenos  $\text{CH}_2\text{Br}$  equivalentes entre sí, pero como en el caso del compuesto **2** los protones de cada metileno son diastereotópicos entre sí. Es decir se presenta en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  una señal doble doblete que integra para 2H con desplazamiento  $\delta_{\text{H}}$  3,76 ppm correspondiente a los protones H1c' y H1b' y con una pequeña diferencia de desplazamiento se ven los protones diastereotópicos correspondientes ( $\delta_{\text{H}}$  3,69 ppm, H1c y H1b). Estos protones presentaron correlación en el espectro de HH COSY con un quintuplete con desplazamiento  $\delta_{\text{H}}$  3,33 ppm (H1a).

Los espectros de RMN (Anexo III) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 10 C, de los cuales dos correspondían a 2 carbonos cuaternarios aromáticos uno con  $\delta_{\text{C}}$  159,2 ppm (C4) y el otro  $\delta_{\text{C}}$  128,6 ppm (C1) y dos señales ubicadas en  $\delta_{\text{C}}$  131,6 ppm (C2 y C6) y  $\delta_{\text{C}}$  114,1 ppm (C3 y C5) correspondientes a los 4 carbonos del anillo disustituído en *para*. En el experimento HMBC (**Figura 68**), se observó correlación a 3 enlaces entre los protones metilénicos (H1b y H1c,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ) con los carbonos

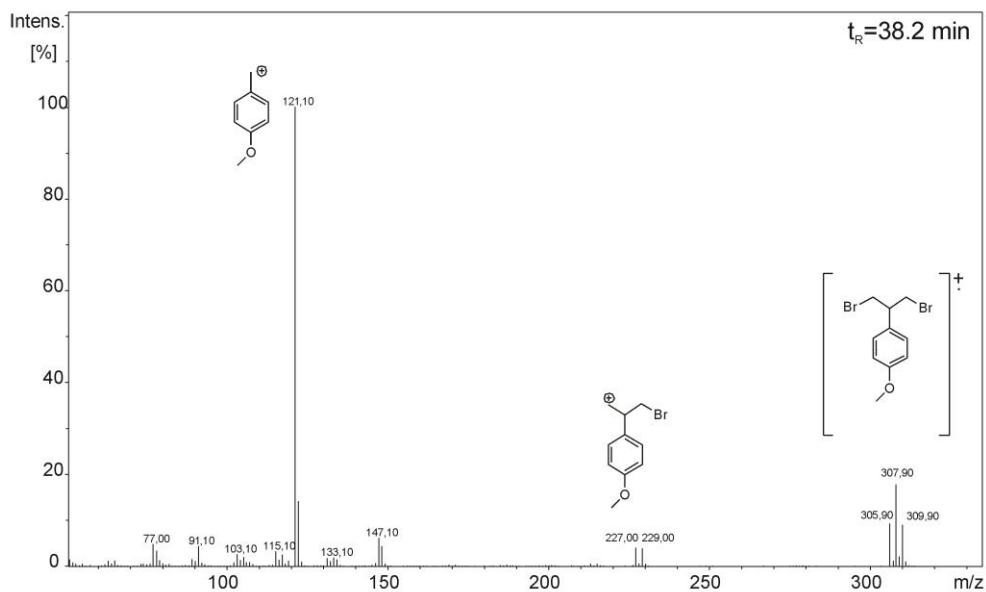
que aparecen a campos más bajos ( $\delta_C$  131,6 ppm, C 2 y C6). Y además presentan correlación con su metileno simétrico, es decir los protones H1b (ambos diastereótopos) presentan correlación a tres enlaces con C1c ( $\delta_C$  52,9 ppm) y viceversa.



**Figura 68.** Espectro de HMBC ampliado (desde 4,40 a 3,00 ppm para F2 y 62 a 100 ppm para F1) del compuesto **3** aislado del AEB de *A. dracunculus*.

El compuesto **3** fue sometido a cromatografía gaseosa, donde el único pico obtenido fue coincidente (en  $t_R$  y fragmentación por IE en espectro de masa) con un pico presente en el cromatograma del aceite esencial modificado de *A. dracunculus*. El pico con  $t_R$  de 38,2 minutos presenta un espectro de masa (**Figura 69**) donde puede observarse el ion molecular de 307,90  $m/z$  y el correspondiente patrón isotópico de un compuesto dibromado. La presencia del fragmento mayoritario  $m/z$  210,10 es una evidencia mas de la simetría de la

molécula, ya que debido a esto la probabilidad de pérdida del fragmento neutro  $\cdot\text{CH}_2\text{Br}$  es la misma.



**Figura 69.** Espectro de masa correspondiente a  $t_R$  de 38,2 minutos del cromatograma gaseoso de compuesto **3**.

A fin de cuantificar la actividad inhibitoria de estos compuestos frente a la enzima acetilcolinesterasa se realizaron ensayos en microplaca. El compuesto **3** posee una  $CI_{50}$  de 88,47  $\mu\text{M}$  y el compuesto **2** posee una  $CI_{50}$  de 70,93  $\mu\text{M}$ . Ambos compuestos son inhibidores débiles de la enzima al ser comparados son el inhibidor de referencia fisostigmina que posee una  $CI_{50}$  de 0,63  $\mu\text{M}$  en las mismas condiciones.

### 3.3 Reacción de fluoración

Con el objetivo de la diversificación química de los componentes de estas mezclas naturales por fluoración se utilizó Selectfluor<sup>®</sup>. Este reactivo electrofílico tiene la particularidad de ser uno de los más seguros dentro de su grupo, relativamente poco tóxico y fácil de manejar.<sup>140</sup> Ha demostrado capacidad para la fluoración de anillos aromáticos, alquenos, posiciones adyacentes a carbonilos e indoles,<sup>141, 142</sup> los cuales resultan ser grupos funcionales comúnmente encontrados en los PNs. Este reactivo puede introducir átomos de flúor en moléculas por reacción con dobles enlaces y anillos aromáticos. Según el Diccionario de Productos Naturales,<sup>16</sup> el 78% de los componentes de aceites esenciales presentes en la base de datos incluye al menos un grupo C=C en sus estructuras, y el 22 % contienen al menos un doble enlace aromático. Selectfluor también puede introducir átomos de flúor a través de la transformación de enlaces carbono-hidrógeno a enlaces carbono-flúor de posiciones saturadas, como carbonos secundarios y terciarios,<sup>143</sup> los cuales se encuentran en el 84 % de los constituyentes de aceites esenciales en la base de datos. Además, este reactivo ha demostrado capacidad para la fluoración de otros grupos funcionales<sup>140</sup> que están presentes en menor medida en los componentes de aceites esenciales tales como enoles (6,8 %) y alquinos (2,5 %).

Las reacciones de fluoración de aceites esenciales se llevaron a cabo en acetonitrilo a ebullición.<sup>140</sup> El reactivo en exceso se separó del aceite esencial fluorado por partición entre acetato de etilo (AcOEt) y una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (Figura 70).

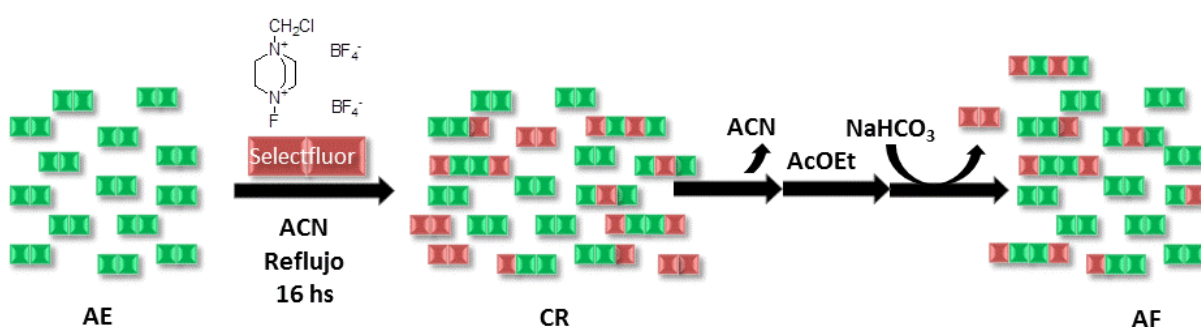


Figura 70. Esquema de protocolo de reacción de fluoración directa.

#### 3.3.1 Modificación de aceites esenciales con flúor

Este protocolo se aplicó a 12 aceites esenciales (AEs) provenientes de las siguientes especies: *Citrus bergamia* L. (bergamota), *Citrus limonum* (L.) Burm. (limón), *Cinnamomum*

*verum* J.Presl (canela), *Eucaliptus globulus* Labill. (eucaliptus), *Artemisia dracunculus* L. (estragón), *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo), *Mentha arvensis* L. (menta), *Coriandrum sativum* L. (coriandro), *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Cupressus sempervirens* L.(ciprés), *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda) y *Myristica fragrans* Houtt. (nuez moscada). En la **Tabla 18** se resumen los porcentajes de recuperación de los aceites esenciales.

**Tabla 18.** Masas recuperadas de AEF relativas a las masas de los AE.

Aceite esencial nativo	% Rendimiento
<i>Citrus bergamia</i>	121,76
<i>Citrus limonum</i>	144,10
<i>Cinnamomum verum</i>	45,91
<i>Eucaliptus globulus</i>	64,06
<i>Artemisia dracunculus</i>	85,93
<i>Foeniculum vulgare</i>	128,28
<i>Menta arvensis</i>	102,60
<i>Coriandrum sativum</i>	121,53
<i>Ocimum basilicum</i>	125,36
<i>Cupressus sempervirens</i>	193,55
<i>Lavandula angustifolia</i>	109,79
<i>Myristica fragrans</i>	103,67

Los porcentajes de recuperación de 9 de los 12 AEs fluorados son mayores al 100%. Tal como fue descrito para la reacción de bromación, esto sugiere un aumento en el peso molecular promedio de los constituyentes de los AEs de partida, el cual podría atribuirse a la incorporación de flúor en sus estructuras.

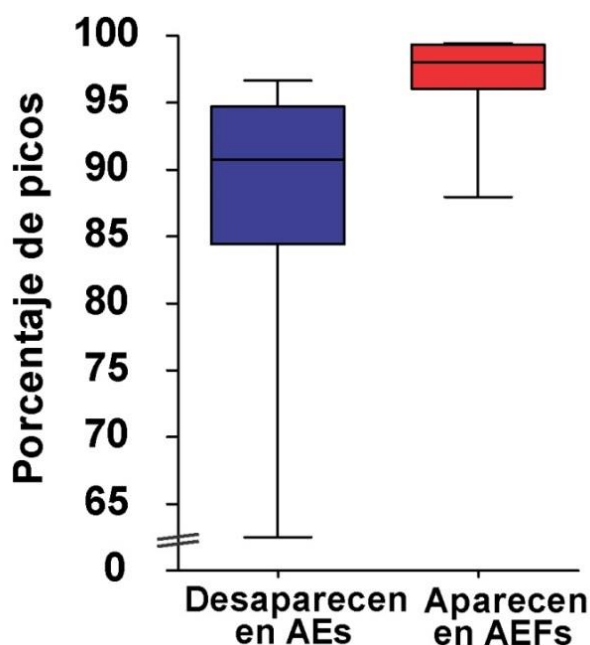
### 3.3.2 *Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con flúor.*

#### 3.3.2.1 **Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con fluor mediante CG-EM.**

Al igual que para los AEBs estas 24 mezclas fueron analizadas por a CG-EM detectando importantes diferencias en los perfiles químicos de los AEs respecto a los AEFs. En la mayoría de los casos, se observó un aumento considerable de la complejidad de los perfiles cromatográficos atribuidos a la formación de diferentes especies fluoradas a partir de un mismo precursor natural.

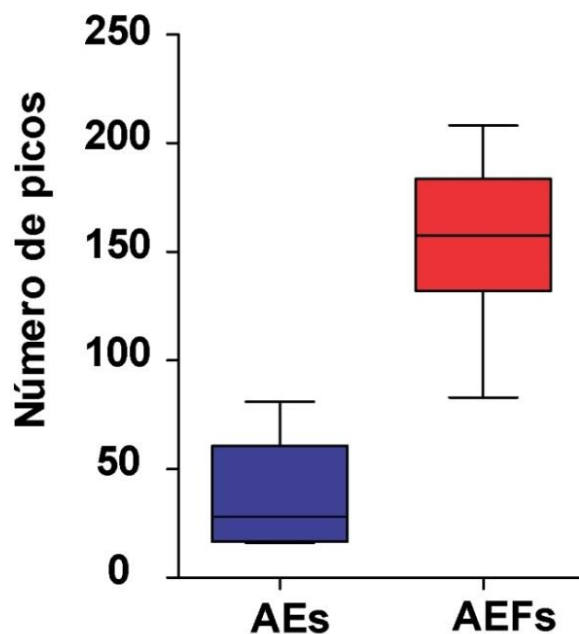
El análisis involucró el conteo de los picos cromatográficos presentes en cada uno de los 24 cromatogramas obtenidos en idénticas condiciones. Posteriormente, cada AEF fue comparado con su respectivo AE de partida en búsqueda de aquellos picos que fueran conservados luego de la reacción. De esta forma al igual que para aceites esenciales modificados con bromo, se obtuvieron los porcentajes de picos que desaparecen y aparecen debido a la reacción de fluoración.

En promedio, el 90 % de los picos detectados en los cromatogramas de los AEs desaparecen como resultado de la reacción mientras que el 96 % de los picos presentes en los AEFs están ausentes en los AEs, es decir representan compuestos nuevos generados por la reacción (**Figura 71**). Estos porcentajes dan cuenta del impacto que tiene la reacción de sobre composición química de los aceites esenciales.



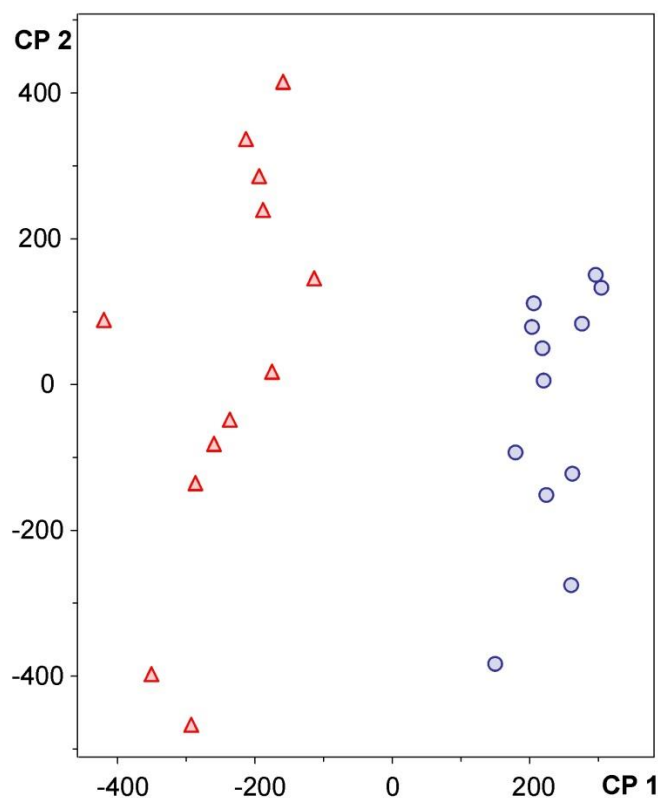
**Figura 71.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del impacto de la reacción de fluoración en la composición química de los aceites esenciales modificados.

Además, en todos los casos la reacción produjo un aumento en el número de picos cromatográficos. El número promedio de compuestos detectados en las mezclas aumenta de 37 (AEs) a 154 (AEFs) debido a la reacción de fluoración (**Figura 72**). Esto sugiere que, en promedio, cuatro compuestos serían generados a partir de cada precursor natural.



**Figura 72.** Diagrama de cajas y bigotes representativo del número total de picos cromatográficos presentes en los aceites esenciales antes (AEs) y después de la reacción de fluoración (AEFs).

Además de estos análisis cuantitativos, los datos obtenidos por CG-EM fueron transformados a un formato bidimensional y procesados estadísticamente (ACP). A partir de este análisis se logró discriminar la población en dos grupos: uno correspondiente a los AEFs (**Figura 73**, triángulos rojos) y otro a los AEs (**Figura 73**, círculos azules).



**Figura 73.** Gráfico de dispersión del CP1 respecto al CP2 de AEF (▲) y sus AEN (●).

Si bien los gráficos de *loadings* del CP1 no son muy indicativos del motivo por el cuál se da la separación en ese componente, a grandes razgos puede observarse que los aceites esenciales fluorados se relacionan con algunos *buckets* con altos tiempos de retención y relación  $m/z$  que tienen valores de CP1 negativos.

Si bien en esta instancia se desconoce la composición química de los AEFs, los resultados en conjunto de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{19}\text{F}$ , RMN de  $^1\text{H}$ -ACP, CG-EM y CG-EM-ACP demuestran la factibilidad de generar compuestos organofluorados a partir de esqueletos de origen natural por medio de reacciones de fluoración.

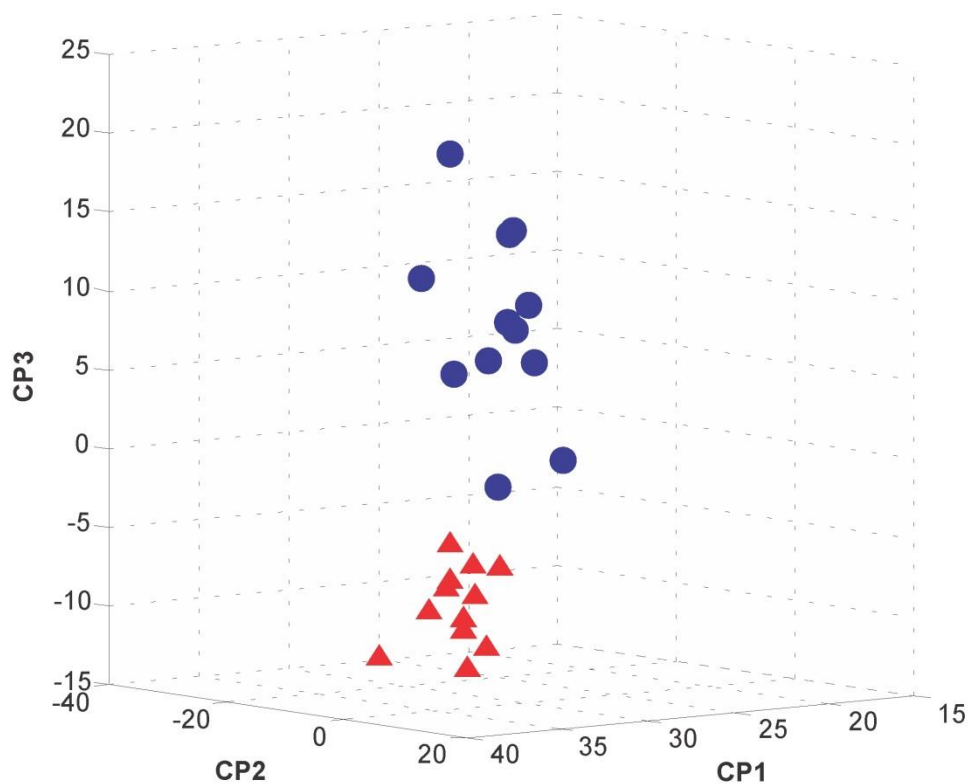
Considerando que se sometieron a la reacción de fluoración 12 aceites esenciales que contienen en promedio 37 compuestos (de acuerdo con los datos promedio de CG-MS, **Figura 72**) de los cuales se modificó en promedio el 90 % de sus componentes (**Figura 71**), podría decirse que esta serie de reacciones han modificado alrededor de 400 compuestos de origen natural. Debe destacarse, que algunos componentes de los aceites esenciales de partida están presentes en más de un aceite esencial, por lo tanto el número total de compuestos diferentes que se modificaron puede ser significativamente inferior a 400.

Considerando que se obtuvieron los respectivos 12 aceites esenciales fluorados que contienen, en promedio, 157 compuestos cada uno (96 % de los cuales no estaban en los AEs de partida, **Figura 71 y 72**), podríamos decir que en total en esta serie de reacciones se produjeron alrededor de 1800 compuestos. Nuevamente, la redundancia en la composición química de los materiales de partida probablemente haga que una proporción más o menos significativa de los mismos sean compuestos repetidos (por provenir de compuestos que estaban presentes en más de uno de los aceites esenciales de partida sometidos a la reacción).

### 3.3.2.2 Comparación de la composición química de aceites esenciales naturales y modificados con flúor mediante RMN de $^1\text{H}$ .

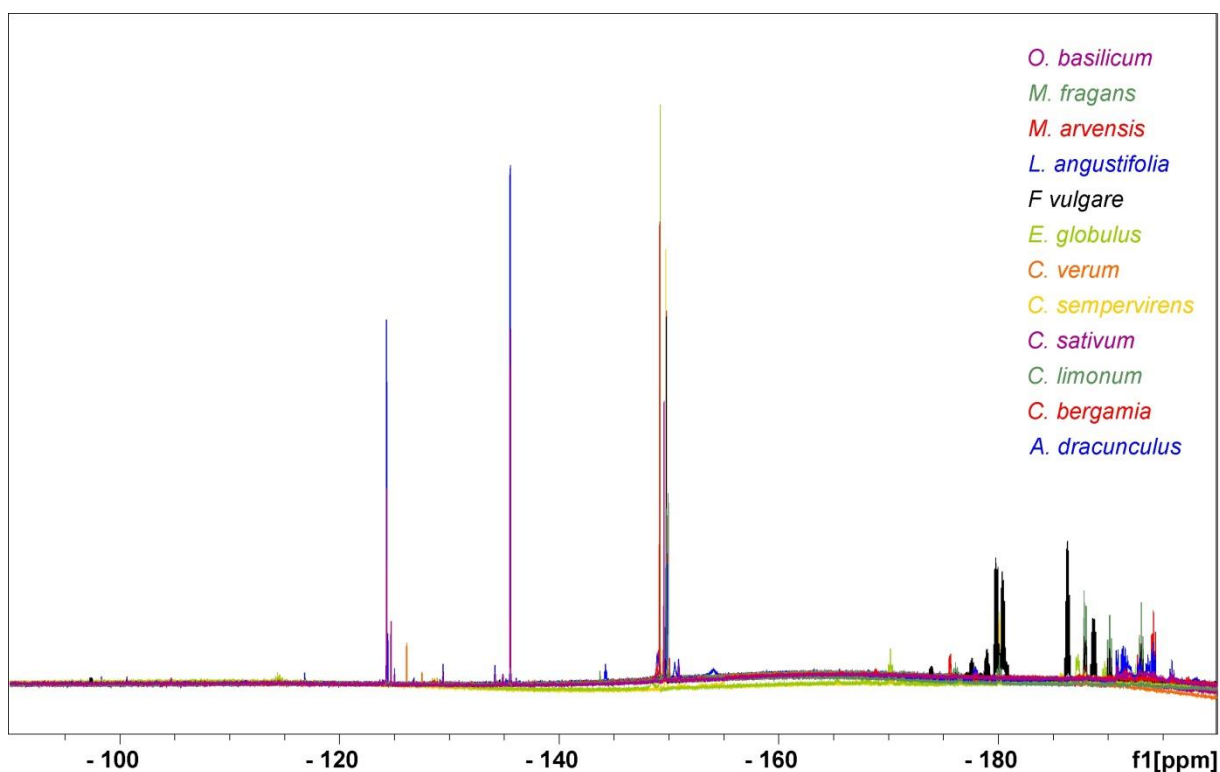
Para comparar las composiciones, se hicieron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de cada uno de los 12 aceites esenciales fluorados (AEFs) y de los correspondientes AEs de partida. Los 24 espectros obtenidos se compararon utilizando ACP. Igual que para las mezclas bromadas, los espectros fueron pre-procesados con ProMetab<sup>130</sup> y procesados con TOMCAT<sup>131</sup> para obtener los CPs.

El gráfico de dispersión de los tres primeros CPs (**Figura 74**) muestra la separación de las muestras en dos grupos, uno correspondiente a los AEs y otro a los AEFs. Estos últimos (triángulos rojos) poseen valores de CP3 negativos, mientras que los AEs (círculos azules) presentan valores positivos para el CP3. Estos resultados indican que la separación de estas muestras se produce principalmente en este componente, pero en el gráfico de *loading* del CP3 no fue posible identificar zonas de desplazamiento químico relacionadas con esta separación.



**Figura 74.** Gráfico de dispersión en 3 dimensiones de los CP1 y CP2 respecto del CP3 de AEFs (▲) y sus AEs (■).

Posteriormente se realizaron espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$ . En la **Figura 75** pueden observarse los espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  de los 12 AEFs superpuestos, donde las señales más abundantes que aparecieron en la zona de desplazamiento químico entre -100 y -200 ppm. Esta zona es característica de anillos aromáticos sustituidos con flúor. Como era de esperar, los espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  de los AEs de partida no mostraron ninguna señal.

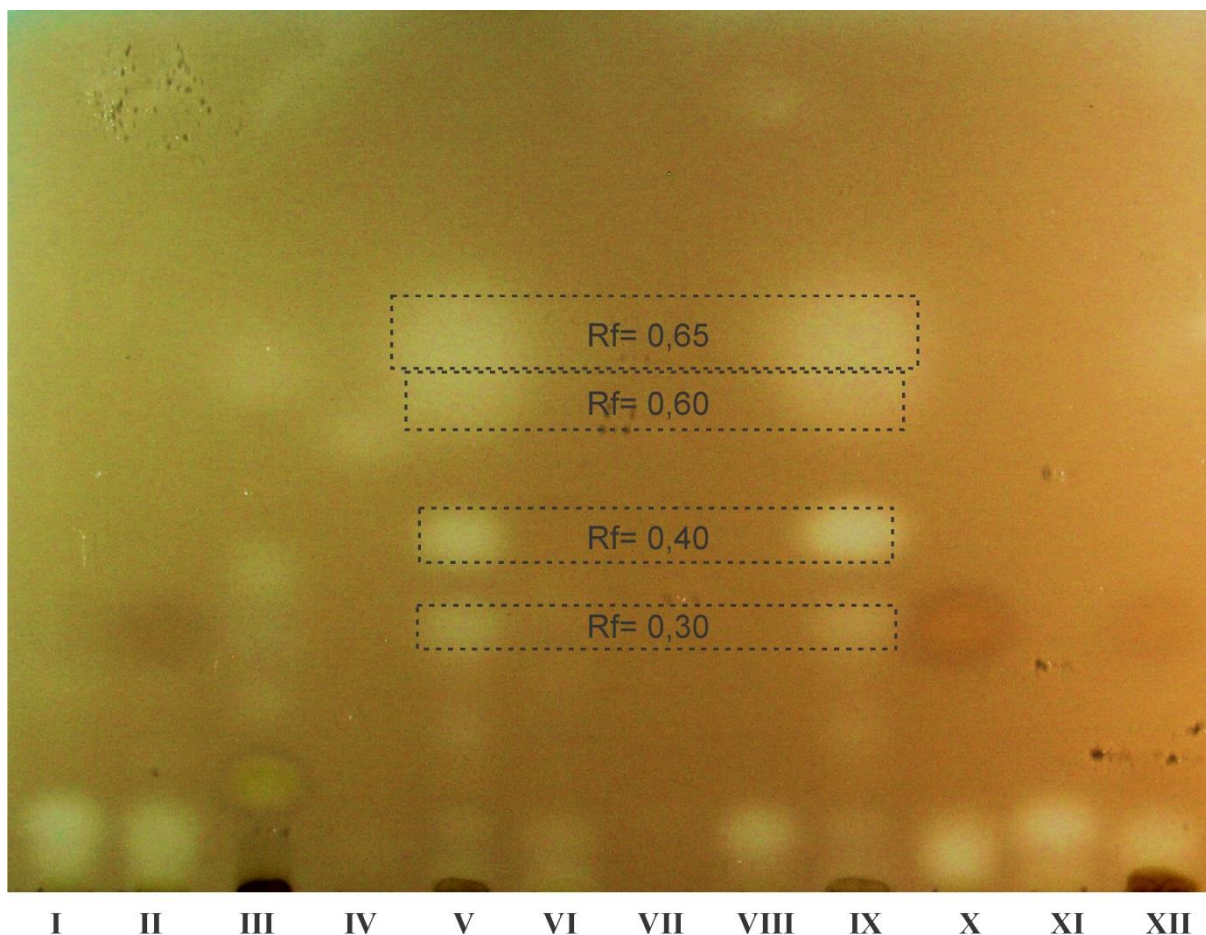


**Figura 75.** Espectros de RMN de  $^{19}\text{F}$  de 12 AEFs superpuestos (desde -90 a -200 ppm)

En conjunto estos resultados sugieren que la reacción produce cambios significativos en la composición química de los aceites esenciales y que esos cambios están, al menos en parte, debidos a la incorporación de flúor en las estructuras de los componentes de estas mezclas.

### 3.3.3 *Análisis de cambios en las propiedades biomoleculares de aceites esenciales modificados con flúor.*

Las 24 mezclas (12 AEs y 12AFs) fueron evaluadas en cuanto a la capacidad inhibitoria de las enzimas acetilcolinesterasa,<sup>132</sup>  $\beta$ -glucosidasa,<sup>65</sup> xantina oxidasa<sup>133</sup> y tirosinasa,<sup>144</sup> y del sistema PhoP/PhoQ de *Salmonella*.<sup>54</sup> Los resultados más interesantes fueron obtenidos para la capacidad inhibitoria de la enzima tirosinasa (**Figura 76**). Donde se observó que once AEFs presentaron al menos un nuevo halo de inhibición (todos menos el AEF de *M. arvensis*, **Figura 76**, calle VII).



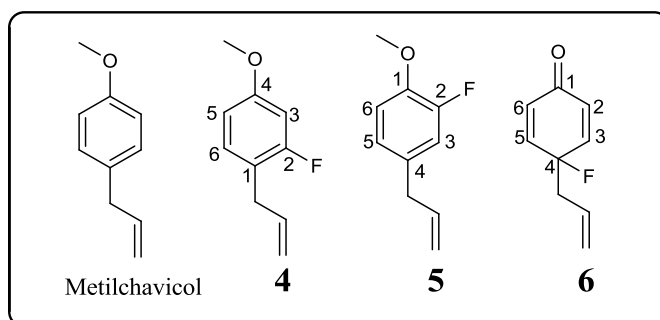
**Figura 76.** Autografía para detección de inhibidores de tirosinasa de AEFs. (I) *Citrus bergamia*, (II) *C. limonum*, (III) *C. verum*, (IV) *E. globulus*, (V) *A. dracunculus*, (VI) *F. vulgare*, (VII) *M. arvensis*, (VIII) *C. sativum*, (IX) *O. basilicum*, (X) *C. sempervirens*, (XI) *L. angustifolia* y (XII) *M. fragrans*. CCD eluída con sistema de solvente Hexano: AcOEt (8:2).

Dentro del grupo, resultaron particularmente interesantes los AEFs de *A. dracunculus* y *O. basilicum* (**Figura 76**, calles V y IX), los cuales presentaron 3 halos nuevos de inhibición luego de la reacción de fluoración, a *Rfs* de 0,63, 0,58 y 0,40 (el halo a *Rf* de 0,31 estaba presente en los AE sin modificar).

### 3.3.4 Aislamiento bioguiado de compuestos activos presentes en los aceites esenciales fluorados de *Artemisia dracunculus* L. y *Ocimum basilicum* L.

A fin de determinar cuales eran los compuestos responsables de la actividades detectadas se realizó una reacción de fluoración del 1-alil-4-metoxibenceno (metilchavicol) el cual se ha reportado como uno de los constituyentes principales de los aceites esenciales de *A. dracunculus*<sup>145</sup> y *O. basilicum*<sup>146</sup> (este hecho fue corroborado durante el análisis por CG-EM de estos dos AEs antes de la reacción de fluoración). Al comparar los perfiles bioautográficos

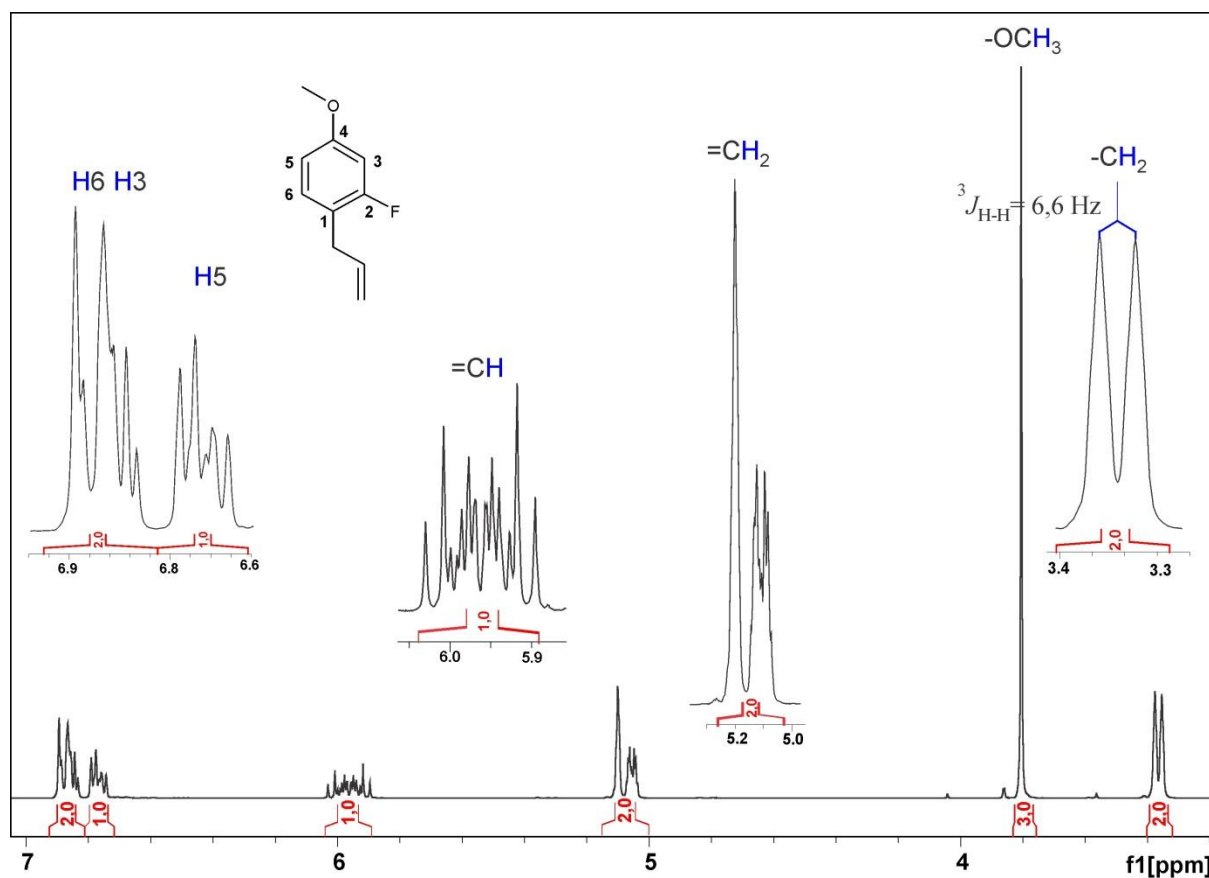
de los aceites esenciales modificados y de la mezcla de productos de la fluoración del metilchavicol con Selectfluor<sup>®</sup> se observaron halos a iguales *R<sub>f</sub>s* indicando que los compuestos activos podrían haber sido generados a partir de la fluoración del metilchavicol. Por lo tanto, se realizó el fraccionamiento de esta mezcla de productos de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel empleando gradiente de Hexano:AcOEt bioguiada por la autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa.<sup>132</sup> En esta etapa se obtuvieron 10 fracciones (F1-F10), resultando activas las fracciones F2, F3 y F5. En las fracciones F2 y F3, se identificaron dos compuestos que son productos de la sustitución aromática del metilchavicol, 1-alil-2-fluoro-4-metoxibenceno (**4**) y 4-alil-2-fluoro-1-metoxibenceno (**5**, **Figura 77**), respectivamente. En tanto que en la fracción F5, se identificó un tercer compuesto, 4-alil-4-fluorociclohexa-2,5-dienona, producto de un proceso de adición eliminación<sup>147</sup> que cursa sobre metilchavicol (**6**, **Figura 77**). Los mismos fueron elucidados utilizando EMAR, CG-EM y RMN (<sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, HSQC (editado en DEPT), HMBC, DEPT, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>HCOSY y DEPT).



**Figura 77.** Compuestos responsables de la actividad inhibitoria de tirosinasa presentes en los AEFs de *A. dracunculus* y *O. basilicum*.

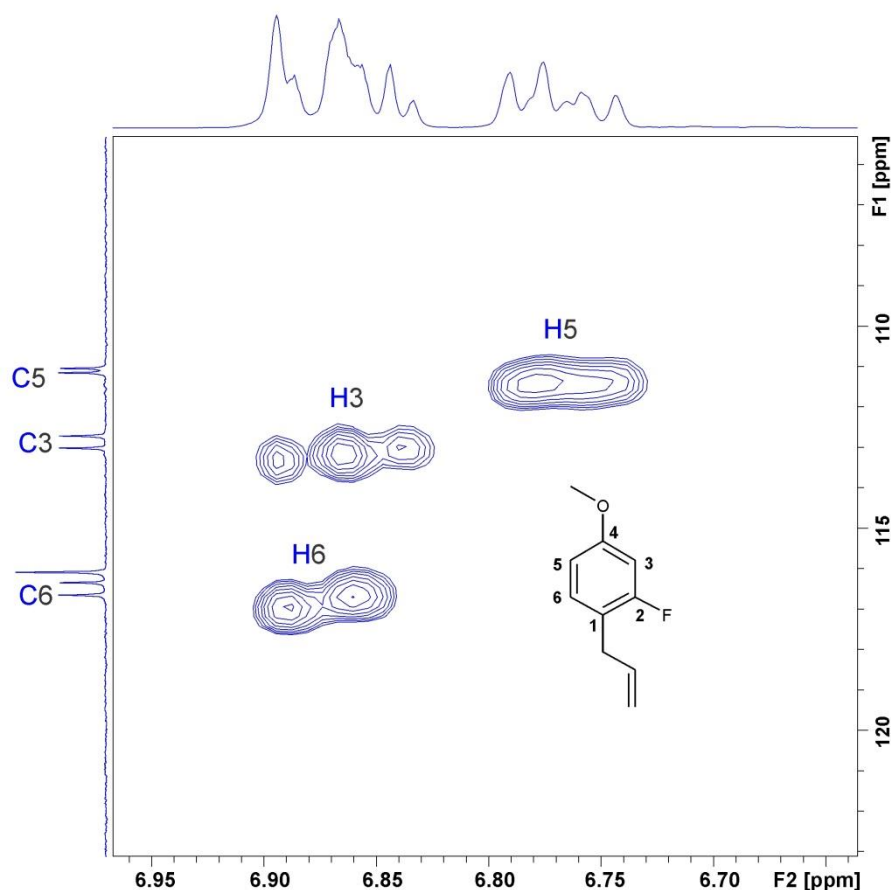
El espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **4** (**Figura 78**) presentó una integración total para 11 H, a campos bajos mostró la presencia de un multiplete en  $\delta_H$  6,86 ppm (2H) correspondientes a los protones en posición 3 y 6 del anillo benceno y otro multiplete en  $\delta_H$  6,76 ppm (1H), correspondientes al protón en posición 5 del mismo anillo. Se evidenciaron además dos multipletes en  $\delta_H$  5,96 ppm (1H, -CH=) y en  $\delta_H$  5,07 ppm (2H, =CH<sub>2</sub>) correspondientes a los protones del grupo vinilo (estos protones pertenecen a un sistema ABX, debido a la complejidad de las señales y a la insuficiente resolución no se pudieron establecer las multiplicidades y acoplamientos). Además se observó un singlete con  $\delta_H$  3,80 ppm con integración para 3H correspondiente a los protones del grupo metoxilo. A campos más altos,  $\delta_H$  3,36 ppm se evidenció un doblete (<sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> =6,6 Hz), con integración para 2

protones, correspondiente al metileno del grupo alilo. La señal del protón con  $\delta_{\text{H}}$  5,96 ppm presento correlación en el experimento de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY con las señales con  $\delta_{\text{H}}$  5,07 ppm y  $\delta_{\text{H}}$  3,36 ppm, evidenciando la vecindad de estos grupos.



**Figura 78.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 7,10 ppm a 3,20 ppm) de 1-alil-2-fluoro-4-metoxibenceno (compuesto 4).

Los espectros de RMN (Anexo IV) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 10 C. Se presentó una señal a  $\delta_{\text{C}}$  157,0 ppm (d,  $J=237,8$  Hz) correspondiente al carbono sustituido con flúor del anillo benceno (C2). Los carbonos cuaternarios sustuidos con grupo alilo (C1) y metoxilo (C4), presentaron desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  130,4 ppm y  $\delta_{\text{C}}$  153,4 ppm, respectivamente. En el espectro de HSQC (editado en DEPT) (**Figura 79**) se observaron además los carbonos correspondientes a las posiciones 5, 3 y 6 del anillo benceno con desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  111,1 (d,  $J=8,3$  Hz), 112,8 ppm (d,  $J=22,7$  Hz), y 116,5 (d,  $J=23,2$  Hz), respectivamente. En desplazamientos de  $\delta_{\text{C}}$  136,1 ppm (CH=),  $\delta_{\text{C}}$  116,1 ppm ( $=\text{CH}_2$ ) y  $\delta_{\text{C}}$  34,0 ppm ( $-\text{CH}_2-$ ); se observaron las señales correspondientes a los carbonos vinílicos y al carbono metilénico del grupo alilo. Se observó a campos altos una señal  $\delta_{\text{C}}$  55,9 ppm correspondiente al carbono del grupo metoxilo.

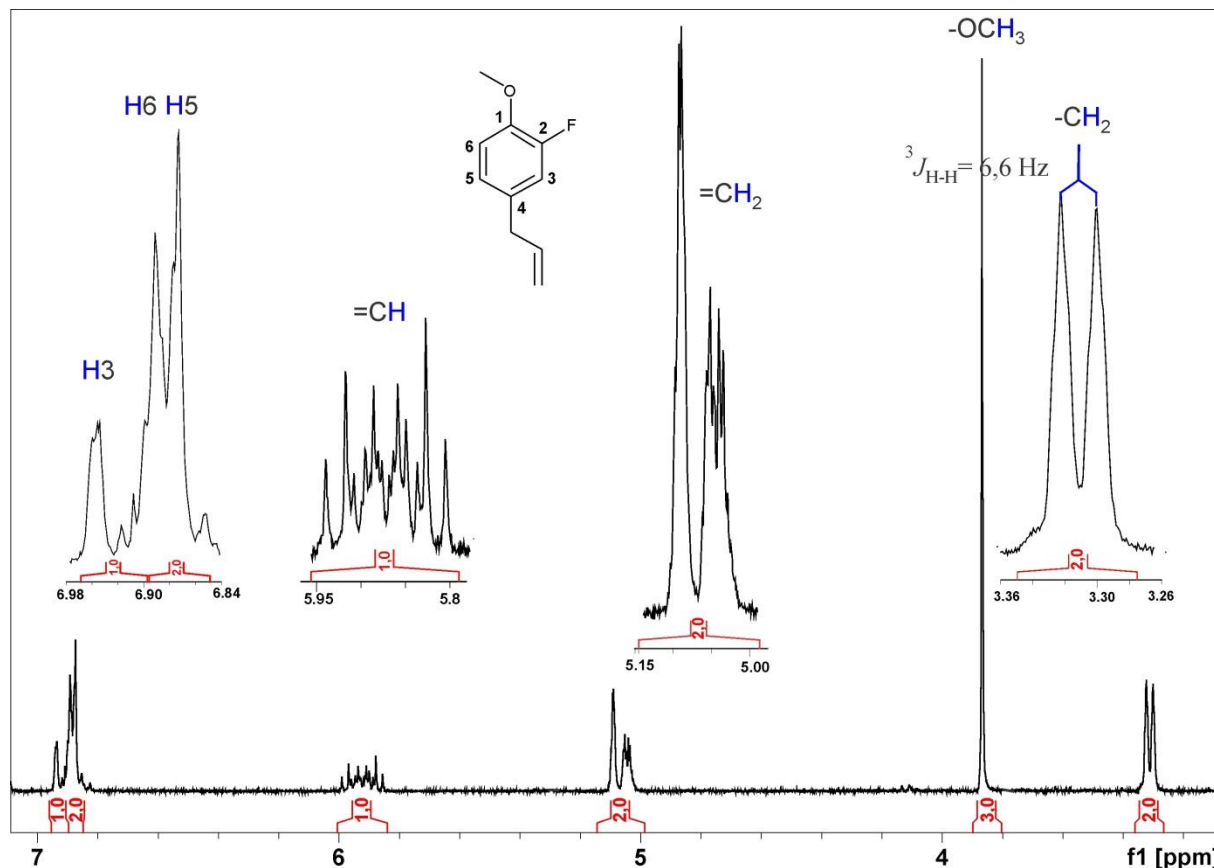


**Figura 79.** Espectro de HSQC (editado en DEPT) ampliado (desde 6,90 a 6,65 ppm para F2 y 123,1 a 105,3 ppm para F1) de 1-alil-2-fluoro-4-metoxibenceno (compuesto **4**).

Por su parte en el espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  se observó una señal con  $\delta_{\text{F}} -124,30$  ppm, evidenciando la presencia de este átomo en la estructura propuesta. Además la fórmula química  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{OF}$  fue verificada mediante EMAR,  $[\text{M}+\text{Na}]$  de  $m/z = 189,0686$  (requerido,  $m/z = 189,0686$ , error = 0,3 ppm).

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **5** (**Figura 80**) presentó una integración total para 11 H, a campos bajos mostró la presencia de un multiplete en  $\delta_{\text{H}} 6,92$  ppm (1H) correspondiente al protón en posición 3 del anillo benceno y otra señal multiplete en  $\delta_{\text{H}} 6,88$  ppm (2H), correspondientes a los protones en posición 6 y 5 del mismo anillo. Se evidenció además dos multipletes en  $\delta_{\text{H}} 5,92$  ppm (1H,  $-\text{CH}=\text{}$ ) y en  $\delta_{\text{H}} 5,06$  ppm (2H,  $=\text{CH}_2$ ) correspondientes a los protones del grupo vinilo (Estos protones pertenecen a un sistema ABX, debido a la complejidad de las señales y baja resolución no se pudieron establecer las multiplicidades y acoplamientos). Además se observó un singlete con  $\delta_{\text{H}} 3,86$  ppm con integración para 3H correspondiente a los protones del grupo metoxilo. A campos más altos,

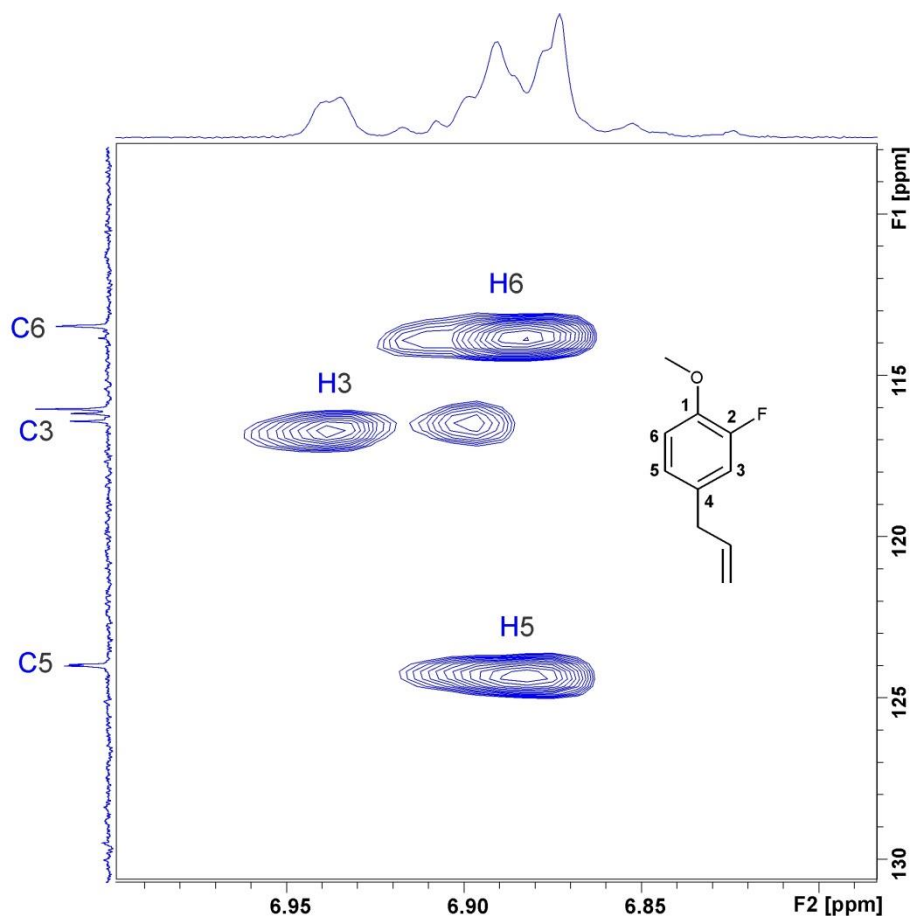
$\delta_{\text{H}}$  3,31 ppm se evidenció un doblete ( $^3J_{\text{H-H}}=6,6$  Hz), con integración para 2 protones, correspondiente al metileno del grupo alilo. La señal del proton con  $\delta_{\text{H}}$  5,92 ppm presento correlación en el experimento de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY con las señales con  $\delta_{\text{H}}$  5,06 ppm y  $\delta_{\text{H}}$  3,31 ppm, evidenciando la vecindad de estos grupos.



**Figura 80.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 7,10 ppm a 3,20 ppm) de 4-alil-2-fluoro-1-metoxibenceno (compuesto 5).

Por su parte, los espectros de RMN (Anexo V) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 10 C. Se presentó una señal a  $\delta_{\text{C}}$  152,3 ppm (d,  $J=245,3$  Hz) correspondiente al carbono sustituido con flúor del anillo benceno (C2). Los carbonos cuaternarios sustuidos con grupo alilo (C4) y metoxilo (C1), presentaron desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  133,2 ppm y  $\delta_{\text{C}}$  145,8 ppm, respectivamente. En el espectro de HSQC (editado en DEPT) (**Figura 81**) se observaron además los carbonos correspondientes a las posiciones posición 6, 3 y 5 del anillo benceno con desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  113,5 ppm (d,  $J=3,4$  Hz), 116,5 ppm (d,  $J=18,1$  Hz) y 123,9 ppm (d,  $J=3,43$  Hz), respectivamente. En desplazamientos de  $\delta_{\text{C}}$  137,0 ppm (CH=),  $\delta_{\text{C}}$  116,1 ppm (=CH<sub>2</sub>) y  $\delta_{\text{C}}$  39,2 ppm (-CH<sub>2</sub>-); se observan las señales correspondientes a los carbonos vinílicos y el

carbono metilénico del grupo alilo. Se observó a campos altos una señal  $\delta_C$  56,4 ppm correspondiente al carbono grupo metoxilo.

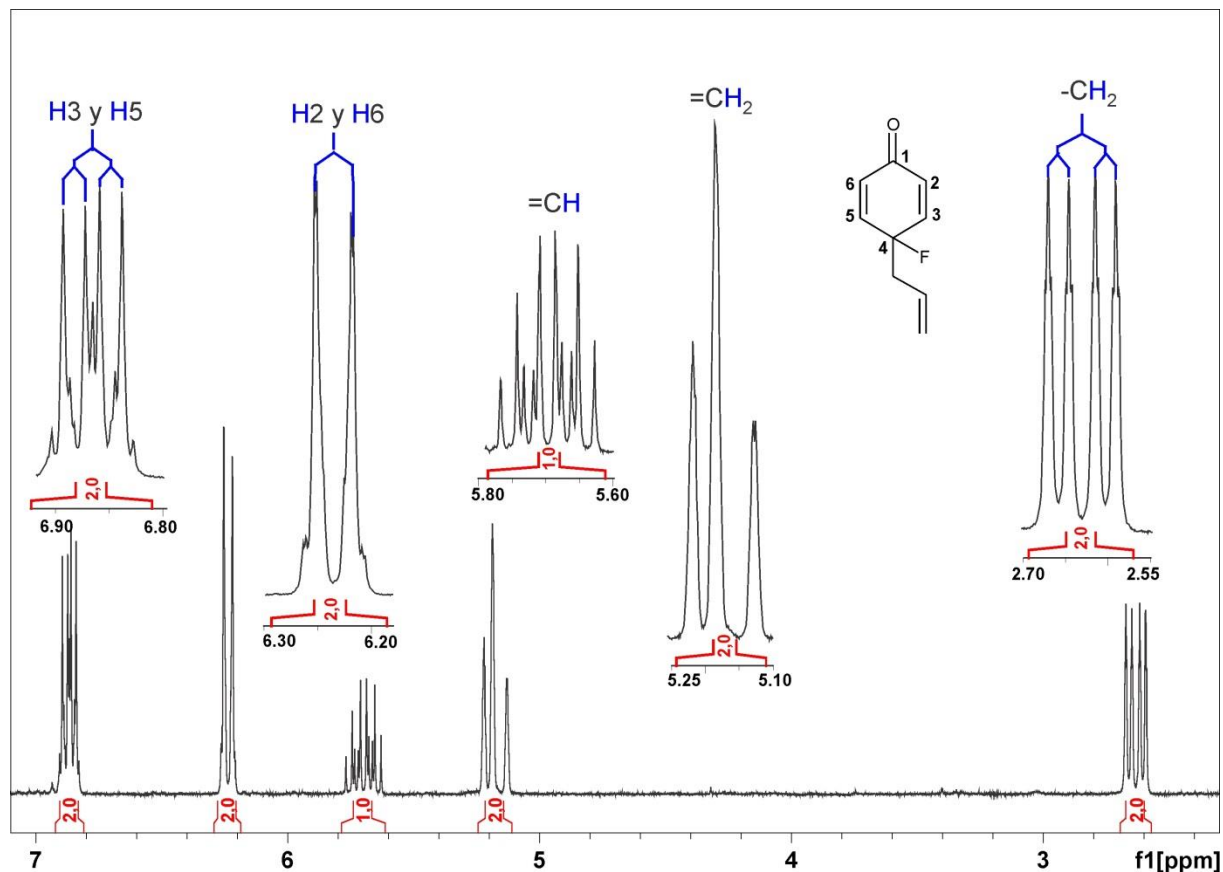


**Figura 81.** Espectro de HSQC (editado en DEPT) ampliado (desde 7,00 a 6,80 ppm para F2 y 130,7 a 107,9 ppm para F1) de 4-alil-2-fluoro-1-metoxibenceno (compuesto **5**).

Por su parte en el espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  se observó una señal con  $\delta_F$  -135,5 ppm, evidenciando la presencia de este átomo en la estructura propuesta. Además la fórmula química  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{OF}$  fue verificada mediante EMAR,  $[\text{M}+\text{Na}]$  de  $m/z = 189,0688$  (requerido,  $m/z = 189,0686$  error = -1,2 ppm).

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **6** (**Figura 82**) presentó una integración total para 9 H, a campos bajos mostró la presencia de un doble doblete en  $\delta_H$  6,86 ppm (2H,  $^3J_{\text{H-H}} = 10,2$  Hz,  $^3J_{\text{H-F}} = 6,2$ ) correspondientes a los protones en posición 3 y 5 de la ciclohexadienona y otra señal en  $\delta_H$  6,23 ppm (m, 2H,  $^3J_{\text{H-H}} = 10,2$  Hz), correspondientes a los protones en posición 2 y 6 del mismo anillo. Se evidenció además la presencia de dos multipletes en  $\delta_H$  5,70 ppm (1H, -CH=) y en  $\delta_H$  5,18 ppm (2H, =CH<sub>2</sub>) correspondientes a los protones del grupo vinilo (estos protones pertenecen a un sistema ABX, debido a la complejidad de las señales y baja resolución no se pudieron establecer las multiplicidades y acoplamientos). A campos más

altos,  $\delta_{\text{H}}$  2,64 ppm se evidenció un doble doblete (2H,  $^2J_{\text{H-H}}=16,2$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}}=7,2$  Hz), con integración para 2 protones, correspondiente al metileno del grupo alilo. La señal del protón con  $\delta_{\text{H}}$  5,70 ppm presentó correlación en el experimento de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY con las señales con  $\delta_{\text{H}}$  5,18 ppm y  $\delta_{\text{H}}$  2,64 ppm, evidenciando la vecindad de estos grupos.

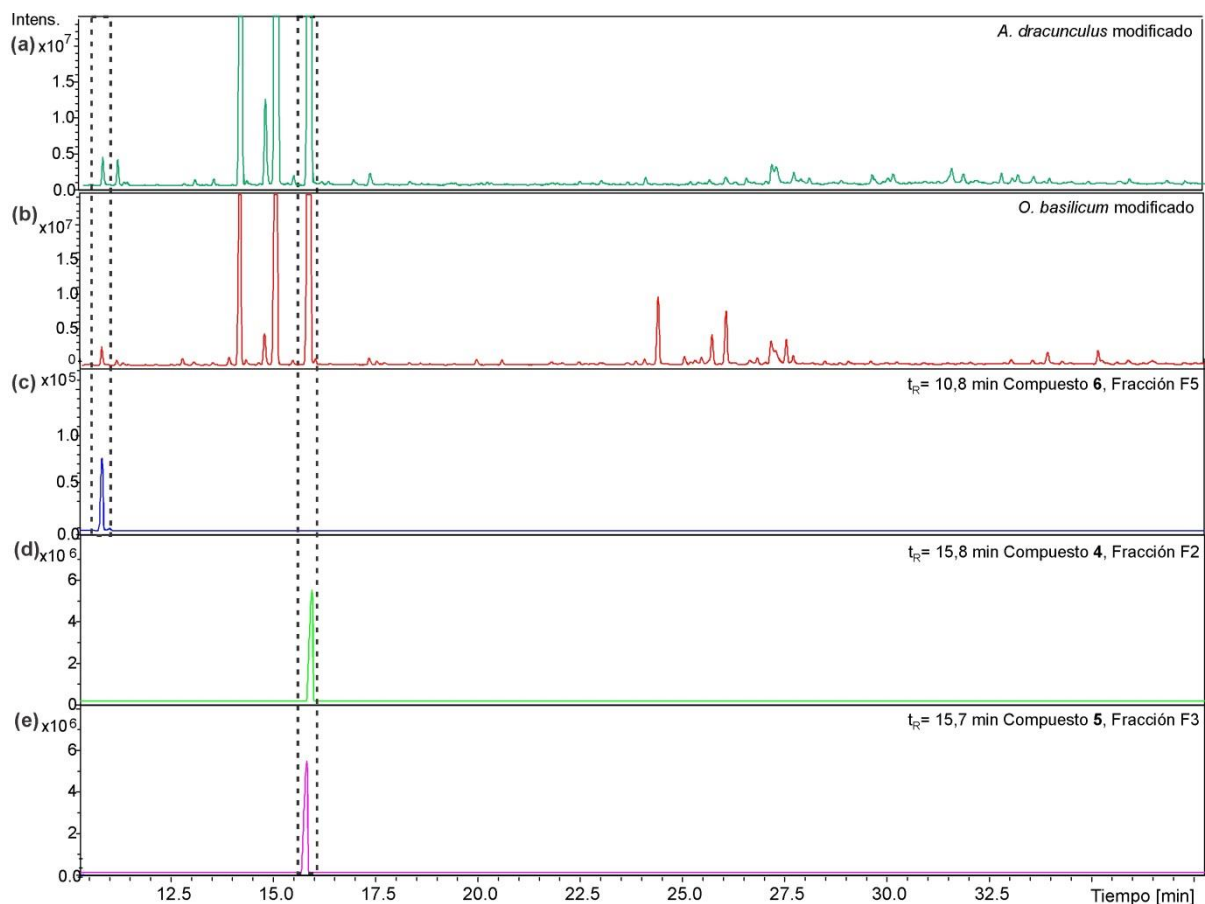


**Figura 82.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (desde 7,10 ppm a 3,10 ppm) de 4-alil-4-fluorociclohexa-2,5-dienona (compuesto **6**).

Los espectros de RMN (Anexo V) de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT, HSQC (editado DEPT) y HMBC indicaron la presencia de 9 C. Se presentó una señal a  $\delta_{\text{C}}$  184,8 ppm (d,  $J=5,48$  Hz) correspondiente al grupo cetona de la dienona, la misma presenta correlación a 3 enlaces en el espectro de HMBC con los protones de  $\delta_{\text{H}}$  6,86 ppm, antes mencionados. Se observaron además los carbonos correspondientes a las posiciones 3 y 5 de la ciclohexadienona con un  $\delta_{\text{C}}$  145,5 ppm (d,  $J=21,28$  Hz); y con un  $\delta_{\text{C}}$  129,5 ppm (d,  $J=6,53$  Hz) los correspondientes a las posiciones 2 y 6. En desplazamientos de  $\delta_{\text{C}}$  129,6 ppm (CH=),  $\delta_{\text{C}}$  121,0 ppm ( $=\text{CH}_2$ ) y  $\delta_{\text{C}}$  43,3 ppm ( $-\text{CH}_2-$ ); se observan las señales correspondientes a los carbonos vinílicos y el carbono metilénico del grupo alilo. El carbono cuaternario en posición 4 de la ciclohexadienona sustituido con fluor presentó un  $\delta_{\text{C}}$  88,3 (d,  $J=166$  Hz).

Por su parte en el espectro de RMN de  $^{19}\text{F}$  se observó una señal con  $\delta_{\text{F}}$  -150,90 ppm, evidenciando la presencia de este átomo en la estructura propuesta. Además la fórmula química  $\text{C}_9\text{H}_9\text{OF}$  fue verificada mediante EMAR,  $[\text{M}+\text{Na}]$  de  $m/z = 175,0524$  (requerido,  $m/z = 175,0530$ , error = 0,2 ppm).

Con el objetivo de verificar que los compuestos activos aislados **4-6** estuvieran presentes en los aceites esenciales fluorados de *A. dracunculus* y *O. basilicum*, se realizaron CG-EM de ambos AEFs y de los tres compuestos aislados. El compuesto **6** presenta un tiempo de retención de 10,8 min (**Figura 83c**) y se encuentra en ambos aceites esenciales en una proporción muy baja (**Figura 83a y b**). Por su parte, los compuestos **4** y **5** poseen tiempos de retención muy similares entre sí ( $t_{\text{R}}$  15,8 min y  $t_{\text{R}}$  15,7 min, respectivamente; **Figura 83d y e**) y por lo tanto sus picos cromatográficos aparecen superpuestos en los cromatogramas de los aceites esenciales fluorados dando lugar a un pico ensanchado que no permite la confirmación de la presencia de ambos (**Figura 83a y b**). Sin embargo esta confirmación provino de los datos de RMN  $^{19}\text{F}$ : en los espectros de los AEFs de *A. dracunculus* y de *O. basilicum* se observaron las señales a  $\delta_{\text{F}}$  -124,30 ppm y -135,5 ppm que corresponden a los átomos de flúor presentes en **4** y en **5** respectivamente.



**Figura 83.** Cromatogramas obtenidos mediante CG-EM (a) aceite esencial modificado de *A. dracunculus*, (b) Aceite esencial modificado de *O. basilicum*, (c) compuesto 6, (d) compuesto 4 y (e) compuesto 5.

A fin de cuantificar la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa se realizaron ensayos en microplaca de ácido kójico, de los compuestos 4-6 y de su precursor el metilchavicol. El metilchavicol resultó ser inactivo en el rango de concentraciones testeado, en tanto que los compuestos 4 ( $CI_{50} = 97,48 \mu\text{M}$ ) y 5 ( $CI_{50} = 174,20 \mu\text{M}$ ) resultaron débiles inhibidores. El resultado más destacado fue el obtenido para el compuesto 6 para el que se determinó un valor de  $CI_{50}$  de  $59,14 \mu\text{M}$ , este compuesto semisintético presenta una actividad similar a la reportada para uno de los inhibidores de referencia para este blanco terapéutico como es el ácido kójico el cual presentó, en las mismas condiciones de experimentación, un valor de  $CI_{50}$  de  $42,16 \mu\text{M}$ .

## **4. CONCLUSIONES**



En vista de que los ensayos autográficos son herramientas de gran utilidad para evaluar la actividad biológica de mezclas complejas y para guiar el aislamiento de compuestos bioactivos presentes en esas mezclas, y de que los ensayos reportados hasta el momento presentan algunas limitaciones, se desarrollaron durante esta tesis dos ensayos autográficos enzimáticos. Uno de ellos permite la detección de inhibidores de la enzima tirosinasa y el otro permite la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa.

Se desarrolló el ensayo para inhibidores de tirosinasa debido a que el único ensayo pre-existente adolece de falta de reproducibilidad, mostrando sensibilidad variable y halos de inhibición difusos que dificultan el análisis de mezclas complejas. Siendo la principal dificultad en el desarrollo de este tipo de ensayos enzimáticos encontrar las condiciones adecuadas para lograr buena reproducibilidad y homogeneidad de color, buena definición de halos y ausencia de resultados falsos (positivos o negativos), se estudiaron las ventajas del uso de geles como soportes enzimáticos. Además, se utilizaron diseño experimental y métodos de optimización multicriterio (Métodos Superficie de Respuesta y uso de funciones de deseabilidad) para buscar condiciones de ensayo óptimas. Esto permitió encontrar condiciones en las que se ve mejorada la sensibilidad y el límite de detección de los ensayos para inhibidores conocidos de las enzimas, realizando un mínimo número de experimentos.

Siguiendo esta estrategia se desarrolló un ensayo autográfico sobre CCD en fase nominal utilizando gel de agar para inmovilizar la enzima y L-tirosina como sustrato. Las condiciones óptimas encontradas fueron: 99,4 nmol/cm<sup>2</sup> de L-tirosina, 7,76 U/cm<sup>2</sup> de tirosinasa y una incubación de 20 minutos a 20°C. En estas condiciones el ensayo autográfico posee un umbral de detección de ácido kójico de aproximadamente 5,2 ng y puede aplicarse para la localización compuestos activos en una matriz químicamente compleja. Esto se estudió investigando la presencia/ausencia de ácido kójico en una matriz dada por un sub-extracto de la planta *Calamagrostis viridiflavescens* (Poir.) Steud. Además de ser complejo e inactivo frente a tirosinasa, este sub-extracto contiene una variedad interesante de componentes que poseen un comportamiento cromatográfico similar al del ácido kójico, por lo que el inhibidor sobre la placa co-existe con una serie de potenciales interferentes. En estas condiciones, el ensayo permitió detectar ácido kójico presente al 0,1 % P/P en la matriz compleja.

Posteriormente se desarrolló un ensayo autográfico para la detección de inhibidores de acetilcolinesterasa sobre CCD. Este desarrollo fue realizado debido a que todos los ensayos

autográficos pre-existentes para inhibidores de esta enzima son incompatibles con cromatografía en fase reversa. El desarrollo introdujo el uso de un copolímero anfifílico para inmovilizar a la enzima, que facilita la formación de un gel revelador homogéneo sobre una superficie hidrofóbica (como es la de las placas cromatográficas de fase reversa). Además, se utilizó un par sustrato/cromógeno que permite la detección tanto bajo luz visible como luz UV<sub>365nm</sub>. De la misma manera que para el desarrollo del ensayo de tirosinasa, se utilizaron diseño experimental y métodos de optimización multicriterio para buscar las condiciones de ensayo óptimas, que fueron: 3,63 mM de sustrato, 2,09 U/mL de enzima, pH=6,00 y 60 minutos de incubación a 37 °C. En estas condiciones el ensayo autográfico detecta hasta 0,1 ng de fisostigmina y puede utilizarse para la localización compuestos activos en una matriz químicamente compleja e inactiva sobre placas cromatográficas de fase reversa y de fase normal. Para esto se investigó la presencia/ausencia de fisostigmina en una matriz compleja inactiva como es el aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore, el cuál contiene una variedad de componentes incluyendo algunos con comportamiento cromatográfico similar a la fisostigmina. El ensayo permitió la detección del inhibidor cuando el mismo esta presente en una concentración del 0,1 % P/P en la mezcla compleja. Los componentes del aceite esencial no generaron falsos positivos, ni interfirieron con el color de la reacción o con la extinción de la fluorescencia.

Este ensayo es además compatible con CCD en fase normal presentando la ventaja, con respecto a los demás métodos reportados, de permitir la visualización de la actividad enzimática de forma dual tanto bajo luz visible como bajo luz UV<sub>365nm</sub>. La sensibilidad de este ensayo resultó inferior a  $1 \times 10^{-4}$  µg, siendo más sensible que algunos de los métodos autográficos reportados para placas de sílica gel que utilizan otros sustratos. Sin embargo, su sensibilidad menor que la del método reportado de mayor sensibilidad.<sup>112</sup>

En conclusión, en esta etapa se desarrollaron dos ensayos autográficos enzimáticos, uno para detectar inhibidores de tirosinasa y otro para detectar inhibidores de acetilcolinesterasa, que presentan buenas reproducibilidad y sensibilidad. Uno de ellos constituye el primer ensayo autográfico enzimático compatible con cromatografía en fase reversa y con doble lectura de resultados (luz visible y fluorescencia).

Posteriormente se comenzó con el estudio del efecto de la reacción de bromación sobre las composiciones químicas y las propiedades biológicas de extractos crudos. En un principio se bromaron 7 extractos de malezas siguiendo dos protocolos, uno que utiliza bromo

en solución y otro que utiliza bromo inmovilizado en un soporte sólido. Para analizar el impacto de la reacción sobre la composición química se utilizaron en conjunto: RMN de  $^1\text{H}$ , CLAE-EM y ACP.

El análisis de principales componentes a partir de los datos de RMN  $^1\text{H}$  permitió: (a) discriminar a los extractos naturales testigos de los extractos modificados e (b) identificar a la desaparición de señales de dobles enlaces como uno de los factores responsables de la discriminación de extractos observada. Es decir que, aún desconociendo la composición de esta serie de mezclas complejas, este análisis detecta diferencias en las composiciones químicas y sugiere que las mismas se centran en uno de los grupos funcionales blanco de la modificación química realizada.

Por su parte, el análisis por CLAE-EM muestra que aproximadamente el 90 % de los picos presentes en los extractos testigos desaparecen debido a la reacción y aproximadamente el 90 % de los picos presentes en los extractos bromados son productos de la reacción (en base a los números promedio para la serie completa de muestras). La combinación de estos datos con un ACP mostró nuevamente la discriminación de los extractos en dos grupos, uno que incluye a los testigos y otro que incluye a los modificados.

De este grupo de extractos modificados, la actividad biológica más interesante se obtuvo para el extracto de *Medicago lupulina* L. modificado con bromo en solución, el cual presentó un halo de inhibición de la enzima  $\beta$ -glucosidasa. El fraccionamiento bioguiado de este extracto bromado llevó a varias fracciones activas, cuya masa fue insuficiente para continuar con el fraccionamiento. Si bien el análisis por RMN de estas fracciones no resultó informativo, el análisis por EMAR de las mismas indicó la presencia de cuatro compuestos con el patrón isotópico característico de los organobromados.

Los resultados obtenidos con los extractos bromados producidos en esta tesis y en trabajos previos del grupo indican que la reacción de bromación resulta interesante para generar compuestos bioactivos. El principal inconveniente de los extractos bromados fue la dificultad experimentada para lograr el aislamiento de los compuestos bioactivos. Dada la reactividad del bromo, es probable que a partir de cada compuesto presente en la mezcla de partida se generen varios compuestos bromados, incrementando significativamente la complejidad de la mezcla. Este aumento en el número de componentes estará asociado con una disminución en su concentración y el hecho que sean compuestos bromados probablemente cause inestabilidad de una parte de los compuestos productos. La combinación

de estos cambios (mayor complejidad, menor concentración, mayor inestabilidad) probablemente sea causante, al menos en parte, de las dificultades experimentadas para el aislamiento de productos bromados a partir de extractos activos. Para investigar estos aspectos se decidió:

- (a) reducir la complejidad de las mezclas naturales de partida utilizando aceites esenciales en lugar de extractos completos y
- (b) reducir la inestabilidad (reactividad) promedio de los productos halogenados generados, incorporando la reacción de fluoración.

La evaluación de aceites esenciales como material de partida para la modificación se basa en que si bien son mezclas naturales complejas, en comparación con los extractos crudos previamente utilizados, contienen un menor número de componentes, que además son más similares entre sí. Entonces se realizó la bromación de 32 aceites esenciales y se evaluaron los cambios en su composición química debidos a la reacción.

De manera similar a lo observado previamente para los extractos, el análisis de principales componentes a partir de los datos de RMN  $^1\text{H}$  separó a los aceites esenciales bromados de los aceites esenciales de partida indicando que esta separación sería en parte producida por transformaciones sufridas por dobles enlaces y/o por dobles enlaces conjugados a anillos aromáticos (grupos blanco de la reacción) y por corrimientos en grupos metilo adyacentes a dobles enlaces. La separación en dos grupos también fue observada cuando el ACP se realizó a partir de los datos de CG-EM. Paralelamente, la comparación de estos cromatogramas mostró diferencias interesantes resultantes de la reacción. Cuando se analizan los números promedio para cada conjunto de 32 muestras (naturales o bromadas), se observa que el 90 % de los componentes son alterados para generar dos productos por cada molécula precursora (1,5 producto bromado por precursor). Si no hubiese compuestos repetidos en los aceites esenciales de partida utilizados, podríamos decir que en total en esta serie de ensayos se produjeron alrededor de 3200 compuestos distintos, de los cuales aproximadamente 2100 son bromados.

La evaluación a través de ensayos autográficos mostró que la reacción produce cambios interesantes en las propiedades biológicas generando un número significativo de halos de inhibición (ausentes en los AEs de partida). Dependiendo de la actividad biológica evaluada, entre el 54 % y el 89 % del total de halos observados en los AEs bromados fueron

resultantes de la reacción. El mayor impacto en las propiedades biológicas de estas mezclas fue observado para la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, donde el porcentaje de nuevos activos es mayor al 80%.

Dos de los AEBs bioactivos, productos de la modificación de los aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* Mill. y de *Artemisia dracunculus* L., fueron sometidos a sendos fraccionamientos bioguiados con el objeto de aislar a los compuestos responsables de las actividades observadas en las mezclas.

El AEB de *F. vulgare* mostró interesantes actividades inhibitorias de las enzimas tirosinasa y xantina oxidasa. Su fraccionamiento guiado por autografía para la detección de inhibidores de tirosinasa llevó al aislamiento de 2-bromo-1-(4-metoxifenil) propan-1-ona (**1**). Este compuesto presentó, en ensayos en microplaca, una  $CI_{50}$  de 21,40  $\mu\text{M}$ , siendo levemente más activo que el inhibidor de referencia ácido kójico que presentó en las mismas condiciones de ensayo una  $CI_{50} = 42,16 \mu\text{M}$ .

El compuesto bromado **1** es además el responsable de la actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa observada en el aceite esencial bromado de *F. vulgare*. Esto fue demostrado utilizando la metodología BIOMSID, que permite acoplar EMAR con halos de inhibición bioautográficos.<sup>132</sup> Esta es la primera aplicación de BIOMSID, más allá de las realizadas durante su puesta a punto, e ilustra la factibilidad de asignar fórmulas moleculares a compuestos activos presentes en mezclas complejas directamente desde bioautografía, aplicando un algoritmo que ha demostrado ser robusto para EMAR. Los ensayos de inhibición de xantina oxidasa en microplaca muestran que el compuesto **1** posee una  $CI_{50}$  de 5,90  $\mu\text{M}$ . Este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud que el del inhibidor de referencia alopurinol, aunque **1** es algo menos activo (la  $CI_{50}$  de alopurinol en esas condiciones es 2,60  $\mu\text{M}$ ).

Por su parte, el AEB de *A. dracunculus* presentó dos halos interesantes en el ensayo de actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa, por lo cual se realizó su fraccionamiento bioguiado utilizando la autografía de esta enzima. Se aislaron e identificaron dos compuestos activos: 1-(2,3-dibromopropil)-4-metoxibenceno (**2**) y 1-(1,3-dibromopropan-2-il)-4-metoxibenceno (**3**). Ambos compuestos son inhibidores débiles de acetilcolinesterasa con valores de  $CI_{50}$  de 88,47  $\mu\text{M}$  (para **2**) y de 70,93  $\mu\text{M}$  (para **3**). Estos valores de  $CI_{50}$  se encuentran dos ordenes de magnitud por encima de los valores observados para el inhibidor de referencia fisostigmina ( $CI_{50} = 0,63 \mu\text{M}$ ).

En vistas de la gran importancia del flúor en química medicinal y de que los metabolitos conteniendo flúor son minoritarios dentro de los PNs halogenados consideramos interesante el desarrollo de condiciones para la incorporación de flúor en las moléculas constituyentes de extractos naturales. Con este fin se realizó la modificación química mediante un protocolo sencillo de fluoración de 12 aceites esenciales sobre los que se evaluaron los efectos de la reacción en la composición química y en las propiedades biomoleculares.

De manera similar a lo observado previamente en los aceites esenciales bromados, el análisis de principales componentes, tanto a partir de los datos de RMN  $^1\text{H}$  como a partir de los datos de CG-EM, produjo la separación de las 24 muestras en: el grupo de los aceites esenciales fluorados y el grupo de los aceites esenciales de partida. Además, la comparación de los cromatogramas mostró diferencias interesantes debidas a la reacción. Si se tienen en consideración los números promedio para cada conjunto de 12 muestras (naturales o fluoradas), se observa que el 90 % de los componentes son alterados para generar cuatro productos por cada molécula precursora (en promedio), y que estos productos representan el 96 % de los componentes de los aceites esenciales fluorados. Si no hubiese compuestos repetidos en los aceites esenciales de partida utilizados, podríamos decir que en total en esta serie de ensayos se produjeron alrededor de 1800 compuestos distintos de los presentes en los materiales de partida. Aunque no es posible estimar qué proporción de los mismos contiene flúor, la incorporación de flúor en los componentes de los AEs fue confirmada por RMN de  $^{19}\text{F}$ .

Al analizar los cambios en las propiedades biomoleculares de las mezclas, los resultados más interesantes fueron obtenidos para los AEFs de *A. dracuncululus* y *O. basilicum*. Ambos AEFs presentaron 3 halos de inhibición de la enzima tirosinasa muy similares, todos resultantes de la reacción de fluoración. Puesto que los dos AEs de partida comparten al metilchavicol como uno de sus componentes principales, se realizó la fluoración de este compuesto observando por autografía la generación de los compuestos responsables de los tres halos de inhibición. La mezcla de reacción fue fraccionada por cromatografía en columna para aislar: 4-allil-2-fluoro-1-metoxibenzeno (**4**), 1-allil-2-fluoro-4-metoxibenzeno (**5**) y 4-fluoro-4-propenilciclohexa-2,5-dienona (**6**). Al cuantificar la actividad inhibitoria de la enzima tirosinasa por ensayos en microplaca, se observó que los compuestos **4** ( $\text{CI}_{50} = 97,48 \mu\text{M}$ ) y **5** ( $\text{CI}_{50} = 174,20 \mu\text{M}$ ) resultaron débiles inhibidores, mientras que el

compuesto **6** mostró una  $CI_{50}$  de 59,14  $\mu$ M, la cual se encuentra en el mismo orden que la mostrada en iguales condiciones por el inhibidor de referencia ácido kójico ( $CI_{50} = 42,16 \mu$ M). Cabe destacarse que el metilchavicol, precursor natural del compuesto fluorado inhibidor **6**, resultó ser inactivo en el rango de concentraciones probado.

En resumen, durante el presente trabajo de tesis se produjeron 18 extractos bromados aplicando dos protocolos de bromación ( $Br_2$  en solución y con resina perbromada) a 7 extractos de malezas. Estas mezclas más otras 8 de la extractoteca del laboratorio fueron utilizadas para evaluar el efecto de las reacciones de bromación sobre la composición química y sobre las propiedades biomoleculares de las mezclas concluyendo que ambas características de las mezclas son alteradas por la reacción. El extracto bromado más interesante fue sometido a fraccionamiento bioguiado observando que las fracciones más activas contenían compuestos bromados pero que, a pesar de realizar las reacciones en escalas mayores, la masa de las fracciones activas era demasiado pequeña para permitir el aislamiento del componente activo en cantidad suficiente como para realizar su elucidación estructural. Esto podría deberse, entre otras cosas: a una complejidad excesivamente alta de los extractos bromados que implique una reducción en la concentración promedio de sus componentes a valores demasiado bajos, a una inestabilidad de los productos bromados activos que favorezca su degradación durante las diferentes etapas de purificación, o a una combinación de ambas.

Al disminuir la complejidad de las mezclas de partida, pasando de extractos crudos a aceites esenciales, se pudo corroborar que la reacción tendía a producir un mayor número de componentes que los contenidos en las mezclas de partida (los aceites esenciales bromados contienen aproximadamente el doble de componentes que los aceites de partida) lo que es de esperar que disminuya la concentración promedio de los productos. Sin embargo la aplicación de métodos cromatográficos convencionales llevó al aislamiento de tres inhibidores enzimáticos bromados sin detectar descomposición. Aunque con un menor número de ejemplos, algo similar pudo observarse cuando se realizaron fluoraciones de aceites esenciales. La composición química se afecta significativamente, incluyendo este cambio un aumento en el número de componentes de las mezclas y la generación de compuestos bioactivos que pueden ser aislados por métodos convencionales (inhibidor de tirosinasa).

Durante este proceso, se trabajó en el desarrollo de herramientas que faciliten el análisis de las mezclas complejas que incluyó la puesta a punto de dos nuevos ensayos autográficos enzimáticos y la conexión de este tipo de ensayos con espectrometría de masa de

alta resolución para facilitar la identificación de compuestos bioactivos presentes en mezclas complejas. La utilidad de estas herramientas no se restringe a la evaluación de extractos modificados, sino que se puede extender a la evaluación de mezclas complejas en general como son los extractos naturales.

Tal vez los resultados más tangibles de este trabajo son la generación, el aislamiento y la elucidación estructural de dos compuestos, uno bromado y uno fluorado, inhibidores de las enzimas xantina oxidasa y tirosinasa cuyas actividades se encuentran en el orden de la actividad de los compuestos de referencia alopurinol y ácido kójico; y muy por encima de las actividades de sus precursores naturales anetol y metilchavicol.

Independientemente de estas moléculas, consideramos que la aplicación de las reacciones y de las herramientas desarrolladas en este trabajo de tesis, a otras mezclas naturales o semisintéticas, llevarán al descubrimiento de otros nuevos compuestos con actividades biológicas interesantes.

## **5.MATERIALES Y MÉTODOS**



### 5.1 Reactivos y solventes

Las columnas cromatográficas en fase normal se realizaron con Sílica Gel 230-400 mesh 60H (Merck). Las columnas cromatográficas por tamiz molecular se realizaron con Sephadex<sup>®</sup> LH20 100 (Sigma).

Las CCD y las autografías fueron desarrolladas con cromatofolios de Sílica gel 60 F254 y RP-18 F254 (sobre aluminio, Merck).

Los reactivos esculina hidrato, resina perbromada comercial Amberlyst A-26 OH, L-tirosina, acetato de indoxilo (AI) y azul de nitrotetrazolio (NBT) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los reactivos tiosulfato de sodio, acetato de sodio, cloruro férrico hexahidratado, ácido acético glacial, fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio y ácido etilendiaminotetracético fueron adquiridos a Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agar fue adquirido a Britania (Buenos Aires, Argentina). Los reactivos ácido *tris* hidrocloreídrico y acetato de 1-naftilo fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). La sal *fast blue B* y la xantina fueron adquiridos de Fluka (Buchs, Switzerland). Poloxámero 407 F-27 micronizado fue donado por Basf Argentina.

Las enzimas  $\beta$ -Glucosidasa (de almendras, EC 3.2.1.21), acetilcolinesterasa (de anguila, EC 3.1.1.7), xantina oxidasa (microbiana, EC 1.1.3.22) y tirosinasa (de hongos, EC 1.14.18.1) fueron adquiridas a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los solventes utilizados fueron previamente rectificadas en nuestro laboratorio exceptuando a los solventes de calidad CL-EM.

### 5.2 Herramientas cromatográficas y espectroscópicas

Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, HH-COSY, HSQC editado, <sup>13</sup>C DEPT y HMBC fueron registrados utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance II de 300 MHz (Bruker, Karlsruhe, Germany). Las muestras fueron disueltas en CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se informaron en ppm en relación al pico de TMS (0 ppm).

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masa (CLAE-EM), se realizaron en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies modelo 1200 RR con la siguiente configuración: desgasificador online modelo G1379B, bomba binaria SL modelo G1312B, inyector-autosampler SL modelo G1367D, termostato y horno de

columnas SL modelos G1330B y G1316B, detector VW SL G1314C. Columna: RF Symmetry® C18 de 150 mm de longitud x 3,9 mm de diámetro interno, con tamaño de partícula de 5 mm. El espectrómetro de masa acoplado al cromatógrafo líquido de alta eficiencia, corresponde a un equipo microTOF-Q II de Bruker Daltonics.

Los análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo gaseoso Agilent modelo 7890B. Columna HP-5MS UI (30m x 0,25mm con 0,25um de film). El espectrómetro de masa acoplado al cromatógrafo gaseoso, corresponde a un equipo Agilent modelo 5977A.

Las imágenes de las CCD y las autografías fueron digitalizadas en un equipo Chromadoc-IT con lámparas de luz visible, UV de 254 nm y 365 nm adicionado con cámara digital Olympus de 5.1 megapíxeles. Los análisis de imágenes se llevaron a cabo utilizando el programa Gel-Pro Analyzer v4.00 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

Las reacciones enzimáticas realizadas durante los ensayos de inhibición enzimática en microplaca de 96 pocillos se monitorearon utilizando un lector de microplacas POLARstar Omega (BMG LABTECH, Offenburg, Alemania)

### 5.3 Reveladores químicos

Los reactivos reveladores empleados, se prepararon de acuerdo a los siguientes protocolos:

Fosfomolibdico: Detección de lípidos, esteroides y esteroides. Reactivo de rociado: solución de ácido fosfomolibdico 20 % en etanol. Luego del rociado las CCDs se sometieron a calentamiento y luego se evaluaron al visible.<sup>148</sup>

*p*-anisaldehído: Detección de azúcares terpenos y esteroides. Reactivo de rociado: Solución de 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,5 mL de anisaldeído en 50 mL de ácido acético glacial. Luego del rociado las CCDs se sometieron a calentamiento y luego se evaluaron al visible.<sup>148</sup>

Vainillina-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Detección de terpenoides y fenilpropanoides. Solución A: vainillina 1 % en etanol. Solución B: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % en etanol. Luego del rociado de A seguido de B las CCDs se sometieron a calentamiento y luego se evaluaron al visible.<sup>148</sup>

## 5.4 Extractos utilizados

El material vegetal utilizado fue recolectado en Pergamino, Provincia de Buenos Aires por el Farm. Oscar Micheloni durante el mes Noviembre del año 2005. En todos los casos se depositó un ejemplar en el Herbario de la UNR con los siguientes códigos: *Conium maculatum* L (Apiaceae) (ID MO007), *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae) (ID MO004), *Rapistrum rugosum* (L.) All. (Brassicaceae) (ID MO014), *Sida rhombifolia* L (Malvaceae) (ID MO030), *Commelina erecta* L. (Commelinaceae) (ID MO002), *Brassica rapa* L. (Brassicaceae) (ID MO003), *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb. (Malvaceae) (ID MO018), *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen var. *Parviflora*. (Poaceae) (ID MO006), *Anagallis arvensis* L (Primulaceae) (ID MO037), *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. (Asteraceae) (ID MO027), *Baccharis ulicina* Hook. & Arn. (Asteraceae) (ID MO029), *Calamagrostis viridiflavescens* (Poir.) Stend (Poaceae) (ID MO015), *Geranium dissectum* L (Geraniaceae) (ID MO039), *Medicago lupulina* L (Fabaceae) (ID MO037) y *Paspalum dilatatum* Poir. Subsp. *dilatatum* (Poaceae) (ID MO025)

### 5.4.1 Extractos metanólicos

Los extractos metanólicos crudos de la extractoteca del grupo utilizados en esta tesis en la Sección 3.2.1 fueron preparados previamente al inicio de este trabajo de tesis por la Dra. I. Ayelen Ramallo y el Dr. Mario O. Salazar.

Los mismos se prepararon a partir de la planta completa (raíz, tallo, hoja, fruto y flor) de cada una de las especies. Cada muestra de material vegetal se secó en estufa y se trituroó con un molinillo. Los extractos metanólicos totales se prepararon empleando MeOH a reflujo (3x 45 minutos). Al término, el material vegetal fue separado por filtración con vacío y los extractos fueron concentrados a presión reducida hasta sequedad en un evaporador rotatorio (T. máx empleada 55°C). Todos extractos se mantuvieron almacenados en heladera (T=8°C). Las proporciones de metanol (mL)/material vegetal (g) utilizadas variaron, según las características de la especie, en un rango de 9 mL/g a 40 mL/g.

### 5.4.2 Preparación de subextracto diclorometánico

Se disolvieron 2 gr de extracto metanólico total en 240 mL de una mezcla DCM:H<sub>2</sub>O (6:4), la mezcla se separó en ampolla de decantación. La fracción acuosa resultante se extrajo nuevamente con DCM (3 x 120 mL), todas las fases diclorometánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

anhidro y se filtraron a presión normal. El solvente se evaporó a presión reducida hasta sequedad en un evaporador rotatorio (temperatura máxima empleada 55°C).

## ***5.5 Desarrollo de nuevas herramientas autográficas para la detección de inhibidores enzimáticos***

### ***5.5.1 Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de tirosinasa***

#### ***Soluciones de trabajo***

##### ***Preparación de solución de enzima tirosinasa***

Se suspendieron 10 mg de liofilizado de enzima (1,881 U/mg) en 10 mL de buffer fosfato 20 mM pH 6,8 y luego se llevó la solución a 10 mL con el mismo buffer (concentración final 1,881 U/mL).

##### **Preparación solución de L- tirosina**

Se disolvieron 10 mg de L-tirosina en un volumen final de 10 mL de buffer fosfato 20 mM, pH 6,8 (concentración final 2,5 mM).

##### **Preparación de gel de poloxámero**

Se disolvieron 25 g de poloxámero 407 micronizado y se llevó a 100 g de peso final con buffer fosfato 20 mM, pH 6,8 (concentración final 25% P/P). Se dejó hidratar durante la noche y se enfrió hasta 8°C en heladera.

##### **Preparación de gel de agar**

Se disolvieron 12 g de agar en un volumen final de 100 mL de buffer fosfato 20 mM de pH 6,8 (concentración final 1,2 % P/V). La solución se llevó hasta 80 °C y se dejó enfriar hasta 35°C.

##### **Preparación de soluciones patrón de ácido kójico para curvas de regresión lineal.**

Se preparan 6 diluciones seriadas al medio de ácido kójico a partir de una solución madre de concentración 0,1 mg/mL de ácido kójico en metanol. Para la preparación de la solución madre se disolvieron 10 mg de ácido kójico en un volumen final de 100 mL de metanol, se tomaron 5 mL de la solución anterior se llevó a 10 mL con metanol, repitiendo este procedimiento hasta obtener 6 diluciones seriadas.

## **Selección de condiciones para la reacción enzimática sobre la placa cromatográfica**

### **Ensayo por rociado directo**

Se roció una placa de 5 x 5 cm con 1 mL de una solución de enzima de 100 U/mL (obtenida tomando 53  $\mu$ L de solución de enzima y agregando 947  $\mu$ L de buffer fosfato 20 mM pH 6,8), para obtener un cubierta final sobre la placa de 4 U/cm<sup>2</sup>. Seguidamente se roció la placa con 1 mL de la solución de sustrato 150  $\mu$ M (obtenida tomando 60  $\mu$ L de solución de sustrato y 940  $\mu$ L buffer fosfato 20 mM pH 6,8), para obtener un cubierta final sobre la placa de 60 nmol/cm<sup>2</sup>. La placa se incubó a temperatura ambiente y se registraron fotográficamente los cambios de color a los 5, 10, 15 y 20 minutos luego del rociado.

### **Ensayo con inmovilización en gel de poloxámero 407**

A 4 mL de solución de poloxámero 407 25 % P/P en buffer fosfato 20 mM (pH 6,8) enfriada a 0 °C se le agregaron 60  $\mu$ L de solución de sustrato y seguidamente 53  $\mu$ L de solución de enzima. Esta solución reveladora fue vertida sobre placas de 5 x 5 cm, para obtener cubiertas de 4 U/cm<sup>2</sup> y 60 nmol/cm<sup>2</sup> de tirosinasa y L-tirosina, respectivamente. Se dejó alcanzar la temperatura ambiente para que se produzca la solidificación del gel y se registraron los cambios de coloración a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

### **Ensayo con inmovilización en gel de agar**

A 4 mL solución de agar 1,2 % P/V en buffer fosfato 20 mM (pH 6,8) a 35 °C se le agregaron 60  $\mu$ L de solución de sustrato y seguidamente 53  $\mu$ L de solución de enzima. Esta solución reveladora fue vertida sobre placas de 5 x 5 cm, para obtener cubiertas de 4 U/cm<sup>2</sup> y 60 nmol/cm<sup>2</sup> de tirosinasa y L-tirosina, respectivamente. Se dejó alcanzar la temperatura ambiente para que se produzca la solidificación del gel y se registraron los cambios de coloración a los 5, 10, 15 y 20 minutos.

### **Ensayo de CCD para curvas de regresión lineal**

Se sembraron en punto, con una microjeringa, 10  $\mu$ L de 6 diluciones de ácido kójico (500- 31,625  $\mu$ g) en placas cromatográficas de 12 x 2 cm.

### **Fase de *screening* de factores significativos**

A una solución de agar de 1,2 % P/V a 35 °C, se le agregaron los volúmenes correspondientes de solución de sustrato y de enzima (para cada uno de los 12 experimentos mostrados en **Tabla 7**, página 56). Las soluciones resultantes se vertieron sobre cada placa.

Las placas con solución reveladora se incubaron a la temperatura y el tiempo correspondiente para cada experimento. Luego de transcurrido el tiempo de incubación las placas fueron fotografiadas bajo luz visible.

### **Fase de optimización**

A una solución de agar de 1,2 % P/V a 35 °C se le agregaron los volúmenes correspondientes de solución de sustrato y de enzima (para cada uno de los 13 experimentos mostrados en **Tabla 8**, página 57). Las soluciones resultantes se vertieron sobre cada placa. Las placas con solución reveladora fueron incubadas a 20 °C y durante 20 minutos, transcurrido este tiempo fueron fotografiadas bajo luz visible.

### **Ensayo autográfico optimizado**

A 7,2 mL de una solución de agar de 1,2 % P/V a 35 °C, se le agregaron 186 µL de la solución de enzima (1881 U/mL) la mezcla se homogenizó cuidadosamente por inversión. Luego se le agregan 1,8 mL de la solución de sustrato (2,5 mM). Esta solución se vertió sobre la placa cromatográfica (45 cm<sup>2</sup>) y se llevó a 20 °C, temperatura a la que las placas son incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (20 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible.

### **Análisis de imágenes**

La densidad óptica de cada halo fue medida usando el programa Gel-Pro Analyzer. El análisis de “*I-D gels*” se llevó a cabo sobre imágenes monocromáticas en escala de grises de las placas de CCD, generadas extrayendo la intensidad a partir de las imágenes a color. Las calles de la CCD fueron definidas manualmente y los halos fueron automáticamente detectados usando la función “*find bright bands in dark background*” del programa para la detección UV<sub>VIS</sub> (medida en nivel de gris x *pixel*<sup>2</sup>)

### **Diseño de experimentos y métodos de superficie de respuesta**

Para realizar el diseño experimental, el ajuste polinómico, ANOVA y los cálculos de deseabilidad se utilizó el programa Design-Expert trial versión 7.0.3 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA).

### **Aplicabilidad del ensayo para detección de inhibidores de tirosinasa en mezclas complejas**

Se sembraron 3 placas cromatográficas de silica gel de 4,5 x 10 cm con el siguiente diseño: calle I, 1 µg de ácido kójico; calle II, 100 µg de fracción diclorometánica de *Calamagrostis viridiflavescens* (Poir.) Stend con 0,1 µg de ácido kójico y calle III, 100 µg de fracción diclorometánica de *C. viridiflavescens*. En todos los casos se sembraron manualmente 10 µL de una solución metanólica usando una microjeringa, en forma de bandas de 0,5 cm. Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo utilizando como fase móvil AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (74:15:11). Previo al agregado de la solución reveladora enzimática o del revelador químico, el solvente es removido de la placa cromatográfica a temperatura ambiente bajo una corriente de aire (20 minutos). Luego se vertió la solución enzimática reveladora sobre la placa cromatográfica y se llevó a 20°C, temperatura a la que las placas son incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (20 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible. Las placas restantes fueron fotografiadas bajo luz UV<sub>254 nm</sub> y 365nm. Posteriormente fueron reveladas químicamente (**Sección 5.3**) con ácido fosfomolibdico y con p-anisaldehído sulfúrico (ésta última fotografiada bajo luz visible y luz UV<sub>365nm</sub>).

#### **5.5.2 Desarrollo de un ensayo autográfico para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa**

##### **Soluciones de trabajo**

##### **Preparación de solución de enzima acetilcolinesterasa**

Se suspendieron 1 mg de liofilizado de enzima (518 U/mg) en 4 mL de buffer fosfato 100 mM pH 6 o pH 8 (según correspondiera) y luego se llevó a 10 mL con el mismo buffer (Concentración final 132,5 U/mL).

##### **Preparación solución de indoxil acetato**

Se disolvieron 39 mg de indoxil acetato en un volumen final de 1 mL de etanol (Concentración final 227 mM).

##### **Preparación de gel de poloxámero 407**

Se disolvieron 20 g de poloxámero 407 micronizado y se llevó a 100 mL de volumen final con buffer fosfato 100 mM pH 6 o pH 8 (según correspondiera) (Concentración final 20% P/V). Se dejó hidratar durante la noche, se enfrió hasta 8°C en heladera.

### **Preparación de soluciones patrón de inhibidores.**

Se realizaron 6 soluciones seriadas al medio de fisostigmina a partir de una solución madre de concentración 1 mg/mL de fisostigmina en etanol. Para la preparación de la misma se disolvieron 10 mg de fisostigmina en un volumen final de 10 mL de etanol, 1 mL de la solución anterior se llevaron a 10 mL con etanol, repitiendo este procedimiento hasta obtener 5 diluciones seriadas.

### **Ensayo de CCD para curvas de regresión lineal**

Se sembraron en punto, con una microjeringa, 10 µL de 6 diluciones de fisostigmina (10, 1, 0,1,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ , and  $1 \times 10^{-4}$  µg de fisostigmina) en placas cromatográficas de fase reversa (14 x 2 cm).

### **Fase de *screening* de factores significativos**

A una solución de poloxámero 407 de 20 % P/V a 0 °C, se le agregaron los volúmenes correspondientes de solución de sustrato y de enzima (para cada uno de los 12 experimentos). Las soluciones resultantes se vertieron sobre las placas y las mismas se incubaron a la temperatura y el tiempo correspondiente para cada experimento.

### **Fase de optimización**

A una solución de poloxámero 407 de 20 % P/V (preparado con buffer fosfato 100 mM pH 8) a 0 °C se le agregaron los volúmenes correspondientes de solución de sustrato y de enzima (para cada uno de los 20 experimentos). Se vertió esta solución sobre la placa y se llevó a 37°C, temperatura a la que las placas fueron incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación correspondiente para cada experimento las placas fueron fotografiadas.

### **Ensayo autográfico optimizado**

A 13,8 mL de una solución de poloxámero 407 de 20 % P/V (preparado con buffer fosfato 100 mM pH 8) a 4 °C se le agregaron 218 µL de la solución de enzima (132,5 U/mL) la mezcla se homogenizó cuidadosamente por inversión. Luego se le agregaron 221 µL de la solución de sustrato (227 mM). Esta solución se vertió sobre la placa cromatográfica (64 cm<sup>2</sup>)

y se llevó a 37°C, temperatura a la que las placas fueron incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (60 min) las placas fueron fotografiadas

#### **Aplicabilidad para detección de inhibidores de AChE en mezclas complejas en CCD-FR.**

Se sembraron 2 placas cromatográficas de fase reversa de 6,4 x 10 cm con el siguiente diseño: calle I, 0,025 µg de fisostigmina (como control positivo en ausencia de la matriz); calle II, 250 µg de aceite esencial de hojas de *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore con 0,025 µg de fisostigmina y calle III, 250 µg de fracción de aceite esencial de hojas de *P. racemosa* (como control de ausencia de actividad en la matriz). En todos los casos, una solución metanólica fue sembrada manualmente usando una microjeringa de 10 µL, como bandas de 0,5 cm. Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo utilizando como fase móvil MeOH conteniendo 0,01 % V/V TEA, donde la fisostigmina aparece como una mancha a un  $R_f = 0,56$ . Previo al agregado de la solución reveladora enzimática o del revelador químico, el solvente fue removido de la placa a temperatura ambiente bajo una corriente de aire (20 minutos). Luego se viertió la solución enzimática reveladora sobre la placa cromatográfica (64 cm<sup>2</sup>) y se llevó a 37°C, temperatura a la que las placas fueron incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (60 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible y luz UV<sub>365nm</sub>.

Se sembró una placa cromatográfica de fase reversa de 2 x 10 cm con 250 µg de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (lemongrass) (25 mg/mL). Una solución metanólica fue manualmente sembrada usando una microjeringa de 10 µL, como bandas de 0,5 cm. Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo utilizando como fase móvil MeOH con 0,01% V/V TEA. Previo al agregado de la solución reveladora enzimática o del revelador químico, el solvente fue removido de la placa a temperatura ambiente bajo una corriente de aire (20 min). Luego se vertió la solución enzimática reveladora sobre la placa cromatográfica (20 cm<sup>2</sup>) y se llevó a 37°C, temperatura a la que las placas fueron incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (60 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible y luz UV<sub>365nm</sub>

#### **Aplicabilidad para detección de inhibidores de AChE en mezclas complejas en CCD en fase normal**

Se sembraron 2 placas cromatográficas de sílica gel como soporte de fase normal de 6,4 x 10 cm con el siguiente diseño: calle I, 250 µg de fracción de (como control de ausencia

de actividad en la matriz), calle II, 250 µg de extracto de *Sonchus oleraceus* L con 0,025 µg de fisostigmina y calle III, 0,025 µg de fisostigmina (como control positivo en ausencia de la matriz). En todos los casos, de una solución metanólica fue manualmente sembrada usando una microjeringa de 10 µL, como bandas de 0,5 cm. Las separaciones cromatográficas fueron llevadas a cabo utilizando como fase móvil DCM:MeOH (60:40) donde la fisostigmina aparece como mancha central a un  $R_f=0,47$ . Previo al agregado de la solución reveladora enzimática o revelador químico, el solvente es removido de la placa a temperatura ambiente bajo una corriente de aire (20 min). Se vierte la solución enzimática reveladora sobre la placa cromatográfica (64 cm<sup>2</sup>) y se lleva a 37 °C, temperatura a la que las placas son incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (60 min) las placas son fotografiadas bajo luz visible y luz UV<sub>365nm</sub>.

### **Análisis de imágenes**

La densidad óptica de cada halo fue medida usando el programa Gel-Pro Analyzer. El análisis de “*1-D gels*” se llevó a cabo sobre imágenes monocromáticas en escala de grises de las placas de CCD, generadas extrayendo la intensidad a partir de las imágenes a color. Las calles de la CCD fueron definidas manualmente y los halos fueron automáticamente detectados usando la función “*find bright bands in dark background*” del programa para la detección UV<sub>VIS</sub> (medida en nivel de gris x pixel<sup>2</sup>) y usando la función “*find dark bands in bright background*” para la detección UV<sub>365nm</sub> (medido en densidad óptica x pixel<sup>2</sup>). Gel-Pro Analyzer 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) fue utilizado para medir las señales de los halos de inhibición.

### **Diseño de experimentos y métodos de superficie de respuesta**

Para realizar el diseño experimental, el ajuste polinómico, ANOVA y los cálculos de deseabilidad se utilizó el programa Design-Expert trial version 7.0.3 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA).

## **5.6 Generación de extractos modificados con bromo**

### **5.6.1 Generación de extractos modificados con bromo en solución**

Protocolo general: Se disolvieron 200 mg de extracto diclorometánico en 15 mL de DCM, mantenidos a -78°C en una mezcla AcOEt y N<sub>2</sub> líquido, se le agregaron 37 µL de Br<sub>2</sub> por goteo. Luego, se mantuvo en agitación a 0 °C durante dos horas. Transcurrido este tiempo

se finalizó la reacción por agregado de 10 mL de una solución de tiosulfato de sodio 10 % P/V. Se procedió a la separación de las fases acuosa y diclorometánica. La fase acuosa fue extraída 3 veces con 10 mL de diclorometano. Los 30 mL producto de la extracción anterior se incorporaron a la primera fase diclorometánica. La solución resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a 30 °C a presión reducida.

### **5.6.2 Generación de extractos modificados con resina perbromada**

Protocolo general: Se disolvieron 200 mg de extracto diclorometánico en 20 mL de DCM, se le agregaron 0,66 g de resina perbromada y se agitó moderadamente durante una hora. Transcurrido este tiempo se filtró con vacío la suspensión con la resina y la resina fue lavada dos veces con 5 mL DCM y dos veces con 5 mL de metanol. Los filtrados se juntaron y la solución resultante se evaporó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a 30 °C a presión reducida.

## **5.7 Generación de extractos testigos**

### **5.7.1 Generación de extractos testigos para extractos modificados con bromo en solución.**

Protocolo general: Se disolvieron 200 mg de extracto diclorometánico en 15 mL de DCM, se le agregaron 10 mL de agua y se separó la fracción diclorometánica en un ampolla de decantación. A la fracción acuosa se extrajo tres veces con 10 mL de DCM. Se juntaron las fracciones diclorometánicas, se evaporó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a 30 °C a presión reducida.

### **5.7.2 Generación de extractos testigos para extractos modificados con resina perbromada**

Obtención de resina Amberlyst A-26® Br<sup>-</sup> a partir de resina comercial: La resina Amberlyst A-26® Br<sup>-</sup> se preparó a partir de la resina comercial Amberlyst A-26 OH<sup>-</sup>, por agitación durante 12 horas en una solución de ácido bromhídrico 1 N. El exceso de bromuro se eliminó por filtración y posterior lavado de la resina con solventes de polaridad decreciente (agua, acetona, diclorometano). El procedimiento realizado es una de las etapas intermedias para la obtención de la resina perbromada.<sup>149</sup>

Protocolo general: Se disolvieron 50 mg de extracto diclorometánico en 5 mL de DCM, se le agregaron 0,4 mg de resina Amberlyst A-26<sup>®</sup> Br<sup>-</sup> y se agitó la suspensión obtenida durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se separó la resina de la solución diclorometánica por filtración con vacío. La resina fue lavada dos veces con 2,5 mL de MeOH y dos veces con 2,5 mL de DCM, se juntaron los filtrados y se evaporaron a presión reducida a 30 °C.

Se agitó 1g de resina Amberlyst A-26<sup>®</sup> OH<sup>-</sup> en 6 mL de una solución de HBr 0,1 N durante 16 horas. La suspensión obtenida se filtró con vacío y se lavó sucesivamente con 40 mL de agua, con 30 mL de acetona y con 30 mL de DCM. La resina obtenida se colocó en una estufa de vacío durante 12 horas a 50°C.

## **5.8 *Análisis de cambios en la composición química de extractos modificados con bromo en solución y resina perbromada***

### **5.8.1 *Comparación de la composición química de extractos naturales y modificados por RMN de <sup>1</sup>H***

Los espectros de extractos modificados y testigos fueron obtenidos a partir de soluciones de 40 mg/mL en CDCl<sub>3</sub> y con las siguientes consideraciones: tamaño *fid* 23.998; número de *scans* 64, ancho espectral 9,9956 ppm y tiempo de adquisición 3,99 segundos.

Los espectros de extractos modificados y testigos se compararon utilizando ACP, el mismo es un método no supervisado de análisis y sirve para reducir la dimensionalidad de datos. La utilización de este método permite maximizar la extracción de información a partir de la generación de nuevas variables denominadas CPs. Estos son creados por combinaciones lineales de las variables de partida, de manera tal que todos los CPs son ortogonales.

Con el objeto de realizar este análisis, inicialmente los espectros de RMN de <sup>1</sup>H fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> De esta manera los espectros son convertidos a un formato apropiado para su análisis multivariado usando el código escrito MATLAB (Versión 7).

El pre-procesamiento de los datos consistió en:

- ✓ Segmentación de los espectros en 1.736 porciones (*bins*) de 0,005 ppm (2,5 Hz) entre los desplazamientos de 0,20 ppm y 8,90 ppm.

- ✓ Remoción de las señales correspondientes al solvente (40 *bins* comprendidos entre 7,25 ppm y 7,27 ppm).
- ✓ Normalización de las áreas espectrales de los 1.736 *bins* restantes respecto al área espectral total (AET).
- ✓ Transformación logarítmica con el objeto de que las variables (*bins*) más pequeñas aumenten en interés respecto a las variables de mayor tamaño.

El resultado final del pre-procesamiento es una matriz de  $60 \times 1.736$  (número de espectros  $\times$  número de *bins* por espectro) a partir de la cual se realiza el análisis estadístico multivariado procesando los datos obtenidos a través de TOMCAT (*Toolbox for multivariate calibration technique*).<sup>131</sup> De esta manera se obtienen los descriptores (CPs), los cuales acumulan la varianza total de la población. Los gráficos de dispersión y *loadings* se realizaron utilizando las funciones graficas de MATLAB (Versión 7).

Para el análisis multivariado los espectros de RMN<sup>1</sup>H fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> Cada espectro fue segmentado en *bins*, se removieron las señales correspondientes al cloroformo, se normalizaron las áreas y transformaron logarítmicamente. El ACP de los datos pre-procesados se realizó utilizando el código de lectura MATLAB 6.5 (*Release 1.3*), TOMCAT.<sup>131</sup>

### ***5.8.2 Comparación de las composiciones químicas de extractos nativos y modificados con bromo por CLAE-EMAR***

#### **Condiciones cromatográficas**

Los cromatogramas de los extractos modificados y extractos testigos fueron obtenidos a partir de soluciones de 20 mg/mL en metanol. Las condiciones cromatográficas y de adquisición de espectros fueron las siguientes:

- ✓ Volumen inyectado: 20  $\mu$ L.
- ✓ Velocidad de flujo: 1,000 mL/minuto.
- ✓ Temperatura: 35,0°C.
- ✓ Fases móviles: A H<sub>2</sub>O-ácido fórmico 0,1%, B Acetonitrilo-ácido fórmico 0,1%
- ✓ Método: 0 minuto 30% B, 0-10 minuto 30-60% B, 10-20 minuto 60-80 % B, 50-53 minuto 100-30 % B, 20-35 minuto 80-95 % B y 35-45 minuto 95 % B .

- ✓ Detector: Tipo de fuente de iones: ESI; modo de ionización negativo. se analizaron todo los iones el rango desde  $m/z$  190 hasta 1250 Da.

### **Pretratamiento de los datos**

Una vez obtenidos los datos, fueron sometidos a un pretratamiento que comprende varios pasos, los cuales se describen, a continuación.

### **Conversión de datos**

Los datos crudos generados por el equipo CLAE-EMAR (formato .d) fueron convertidos al formato mzData, usando el programa Bruker Compass DataAnalysis 1.3 (Bruker Daltonik GmbH). Posteriormente, los datos en el nuevo formato fueron importados al programa mzMine<sup>124</sup> para los pasos de filtración, detección de picos y alineamiento, del pretratamiento. Este programa es ampliamente usado en análisis metabolómicos, por su versatilidad y compatibilidad con diferentes paquetes estadísticos.

### **Detección de picos**

La detección de picos permite identificar todas las señales generadas por iones “verdaderos” y evita la detección de falsos positivos. Este paso, dentro del programa se realiza en cinco módulos: *Mass detection*, *Chromatogram building*, *Peak deconvolution* y *Deisotoping*. El módulo *Mass detection* permite eliminar los efectos causados por el ruido de la medición o la línea base; el nivel de ruido seleccionado fue de  $1 \times 10^2$  counts/s (cps). Los picos que presentaron una intensidad por debajo de este valor no son incluidos y por lo tanto se excluyen de la lista de las masas de los iones que se genera por cada *scan*. El módulo *Chromatogram building*, toma la lista de masas generada en el paso anterior y construye por deconvolución el cromatograma de acuerdo a cada masa que puede detectar continuamente sobre los *scans*; se determinó como tiempo mínimo de espacio entre *scans* 0,03 minutos, una altura mínima de  $1 \times 10^5$  counts/s (cps) y una tolerancia de 0,02 en  $m/z$ . El módulo *Peak deconvolution* permite separar los picos individuales desde los cromatogramas obtenidos en *chromatogram building*; existen diferentes algoritmos que permiten realizar este paso, la selección dependerá del tipo de datos que se hayan obtenido, para el presente trabajo se eligió Staviszky-Golay, ya que realiza un suavizado de las señales que permite analizar datos que presentan ruido significativo y de variada intensidad; la altura mínima de los picos se estableció de  $1 \times 10^5$  counts/s (cps), el rango de duración del pico entre 0-2 min y la amplitud

del ruido de  $1 \times 10^3$  counts/s (cps). El módulo *Deisotoping* determina cuales picos en la lista de señales forman un patrón isotópico, guarda la información acerca de la proporción y carga de estos y, deja las señales que corresponden al isotopo más alto; para el estudio se estableció una tolerancia de 0,02 en  $m/z$  y carga máxima de 2.

### **Alineamiento**

El propósito de este paso es generar una nueva lista en la que se hace coincidir los picos obtenidos para las diferentes muestras. El algoritmo usado fue RANSAC alignment, el cual alinea tomando como lista de picos principales los de la primera muestra, y en base a este alinea el resto de las muestras. Adicionalmente, corrige cualquier desviación lineal o no lineal en el tiempo de retención de los cromatogramas mediante la creación de un modelo de desviación. Los parámetros establecidos fueron: tolerancia de 0,001 en  $m/z$ , tolerancia del tiempo de retención de 0,1 minutos, tolerancia del tiempo de retención después de la corrección en 0,05 min, el número de interacciones RANSAC en 10000, el mínimo número de puntos en 50 y modelo lineal.

### **Análisis estadístico descriptivo**

Los resultados obtenidos en la etapa anterior se resumen en la **Tabla 19a** para extractos testigos (ET) y modificados (EM) por reacción de bromación en solución y en la **Tabla 20a** para la reacción de bromación con resina perbromada. Se calcularon los porcentajes que desaparecen (Ecuación 2), aparecen (Ecuación 3) y no son alterados por la reacción (Ecuación 4).

Ecuación 2

$$\text{Desaparecen en ET (\%)} = \frac{(ET - \text{Alineados})}{ET} \times 100$$

Ecuación 3

$$\text{Aparecen en EM (\%)} = \frac{EM - \text{Alineados}}{EM} \times 100$$

Ecuación 4

$$\text{No Alterados (\%)} = \frac{\text{Alineados}}{ET} \times 100$$

Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 19b** para la reacción con bromo en solución, y en la **Tabla 20b** para la reacción con resina perbromada.

**Tabla 19.** Datos resultantes del análisis de picos cromatográficos. **(a)** Número de picos detectados en testigos y modificados con bromo en solución; y picos alineados. **(b)** Porcentaje de picos que desaparecen, aparecen y no alterados luego de la reacción.

Especie vegetal de Partida	Número de picos <sup>a</sup>			Porcentaje de picos <sup>b</sup>		
	ET	EM	Alineados	Desaparecen en ET	Aparecen en EM	No alterados
<i>A. arvensis</i>	219	196	10	95,43	94,90	4,57
<i>B. spicata</i>	382	251	20	94,76	92,03	5,24
<i>B. ulicina</i>	250	192	24	90,40	87,50	9,60
<i>C. viridiflavescens</i>	214	193	12	94,39	93,78	5,61
<i>G. dissectum</i>	246	202	11	95,53	94,55	4,47
<i>M. lupulina</i>	413	256	39	90,56	84,77	9,44
<i>P. dilatatum</i>	254	154	19	92,52	87,66	7,48
<i>C. maculatum</i>	301	127	25	91,69	80,31	8,31
<i>M. brachycephana</i>	423	256	42	90,07	83,59	9,93
<i>R. rugosum</i>	271	293	32	88,19	89,08	11,81
<i>S. rhombifolia</i>	391	157	18	95,40	88,54	4,60
<i>C. erecta</i>	221	143	15	93,21	89,51	6,79
<i>B. rapa</i>	165	204	23	86,06	88,73	13,94
<i>S. bonariensis</i>	170	316	21	87,65	93,35	12,35
<i>S. parviflora</i>	215	198	15	93,02	92,42	6,98

**Tabla 20** Datos resultantes del análisis de picos cromatográficos. **(a)** Número de picos detectados en testigos y modificados con resina perbromada; y picos alineados. **(b)** Porcentaje de picos que desaparecen, aparecen y no alterados luego de la reacción.

Especie vegetal de Partida	Número de picos			Porcentaje de picos		
	ET	EM	Alineados	Desaparecen en ET	Aparecen en EM	No alterados
<i>A. arvensis</i>	51	133	7	86,27	94,74	13,73
<i>B. spicata</i>	333	233	51	84,68	78,11	15,32
<i>B. ulicina</i>	197	126	20	89,85	84,13	10,15
<i>C. viridiflavescens</i>	138	63	14	89,86	77,78	10,14
<i>G. dissectum</i>	213	91	14	93,43	84,62	6,57
<i>M. lupulina</i>	298	117	12	95,97	89,74	4,03
<i>P. dilatatum</i>	61	162	19	68,85	88,27	31,15
<i>C. maculatum</i>	297	100	8	97,31	92,00	2,69
<i>M. brachycephana</i>	269	144	9	96,65	93,75	3,35

<i>R. rugosum</i>	680	78	18	97,35	76,92	2,65
<i>S. rhombifolia</i>	288	75	9	96,88	88,00	3,13
<i>C. erecta</i>	251	133	12	95,22	90,98	4,78
<i>B. rapa</i>	282	171	15	94,68	91,23	5,32
<i>S. bonariensis</i>	351	93	26	92,59	72,04	7,41
<i>S. parviflora</i>	98	127	11	88,78	91,34	11,22

Además se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos correspondientes a la estadística descriptiva para cada conjunto de datos, utilizando el programa GraphPad Prism v 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los mismos se resumen en la **Tabla 21** para reacción de bromación con bromo en solución, **Tabla 22** con resina perbromada y **Tabla 23** para picos no alterados por ambas reacciones

**Tabla 21.** Parámetros estadísticos obtenidos del cálculo de los porcentajes promedio de picos que desaparecen en los extractos testigo (ET) y aparecen en los extractos modificados (EM) para la reacción con bromo en solución.

Parámetros estadísticos	Desaparecen en ET (%)	Aparecen en EMB (%)
Número de valores (n)	15	15
Mínimo	86,06	80,31
Percentil 25%	90,07	87,50
Mediana	92,52	89,08
Percentil 75%	94,76	93,35
Máximo	95,53	94,90
Media	91,93	89,38
Desviación estándar	3,04	4,25
Error estándar	0,78	1,10
Intervalo de confianza	(90,24; 93,61)	(87,03;91,74)

**Tabla 22.** Parámetros estadísticos obtenidos del cálculo de los porcentajes promedio de picos que desaparecen en los extractos testigo (ET) y aparecen en los extractos modificados (EM) para la reacción con resina perbromada.

Parámetros estadísticos	Desaparecen en ET (%)	Aparecen en EMR (%)
Número de valores (n)	15	15
Mínimo	68,85	72,04
Percentil 25%	88,78	78,11
Mediana	93,43	88,27

Parámetros estadísticos	Desaparecen en ET (%)	Aparecen en EMR (%)
Percentil 75%	96,65	91,34
Máximo	97,35	94,74
Media	91,22	86,24
Desviación estándar	7,42	7,01
Error estándar	1,92	1,81
Intervalo de confianza	(87,12;95,33)	(82,36;90,13)

**Tabla 23.** Parámetros estadísticos obtenidos del cálculo de los porcentajes promedio de picos que no son alterados en los extractos testigo (ET) para la reacción con bromo en solución (EMB) y resina perbromada (EMR).

Parámetros estadísticos	No alterados EMB (%)	No alterados EMR (%)
Número de valores (n)	15	15
Mínimo	4,47	2,65
Percentil 25%	5,24	3,35
Mediana	7,48	6,57
Percentil 75%	9,93	11,22
Máximo	13,94	31,15
Media	8,07	8,77
Desviación estándar	3,03	7,42
Error estándar	0,78	1,92
Intervalo de confianza	(6,39;9,76)	(4,67;12,88)

### **Análisis estadístico multivariado mediante ACP.**

#### **Transformación de datos a formato tabular**

Los datos en bruto de los cromatogramas obtenidos por CLAE-EM (sin pre-tratamiento) se transformaron a un formato tabular (información bidimensional). Para esta transformación se utilizó una técnica llamada *bucketing*. Para este análisis se utilizó el programa ProfileAnalysis v 2.00 (Bruker Daltonik GmbH)

Cada punto de datos del cromatograma se describe por su tiempo de retención (RT), valor de  $m/z$  e intensidad (información tridimensional). El *bucketing* subdivide todos los

tiempos de retención especificados (RT) y los rangos de masas en distintos pares de valores de RT-  $m/z$  que se llaman *buckets*. Por lo tanto, el *bucketing* reduce drásticamente el número de puntos de datos de un análisis de CL- EM a una serie clara de las variables definidas por los valores estadísticos (*buckets* e intensidades).

Parámetros para generación de *buckets* y modelo de ACP:

Rango de  $t_R$  (minutos): 2-42

Rango de masas ( $m/z$ ): 149-1251

*Bucketing* rectangular:  $\Delta t_R$  (minutos): 1;  $\Delta m/z$ : 50

Normalización: Respecto al *bucket* de mayor intensidad del conjunto de datos.

El resultado final fue una matriz de  $30 \times 920$  (número de cromatogramas  $\times$  número de *buckets* por cromatograma) a partir de la cual se realizó el ACP.

### 5.9 Fraccionamiento bioguiado del extracto diclorometánico modificado de *Medicago lupulina* L.

Se sometieron 2,9114 g del extracto diclorometánico de *M. lupulina* modificado con bromo en solución a CC sobre Sephadex LH-20. De este procedimiento se obtuvieron 56 fracciones las cuales fueron reagrupadas en función de la similitud de sus perfiles químicos y de actividad en 12 nuevas fracciones. Estas fracciones fueron primero analizadas con respecto a su actividad biológica por autografía para detección de inhibidores de  $\beta$ -glucosidasa (**Sección 5.18.5**) de placas cromatográficas corridas en FM= DCM:MeOH (80:20), este análisis muestra halos de inhibición en el punto de siembra y a *Rfs* de 0,2 y 0,3. En la etapa posterior, solo se continuó con el análisis de 6 fracciones que resultaron activas las cuales se encuentran resumidas en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Resumen de actividades para fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de sephadex LH-20

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-

Se disolvieron las fracciones en idéntico volumen de metanol con el objetivo de mantener la proporción en que fueron eluidos de la columna los compuestos (1 mL de metanol calidad CLAE-EM). Posteriormente, para tener más información sobre la composición

química de cada fracción, las mismas fueron analizadas por espectrometría de masa mediante infusión directa en modo de ionización negativo. Entre los iones moleculares presentes en cada fracción se encuentran 4 iones moleculares que tienen el patrón isotópico característico de los compuestos que contienen bromo en su estructura. En la **Tabla 25** se resumen las intensidades absolutas de estos fragmentos en cada fracción.

**Tabla 25.** Resumen de intensidades absolutas de fragmentos con patrón isotópico típica de compuestos bromados presentes en las fracciones activas obtenidas a partir del fraccionamiento realizado al escalado de la reacción de bromación en solución para *M. lupulina*

Fracciones	$m/z$ (M-H) 410	$m/z$ (M-H) 424	$m/z$ (M-H) 488	$m/z$ (M-H) 548
F2	16565	59273	4242	1684
F3	31253	94423	7888	1132
F4	38731	10618	7033	1746
F5	18635	1029	4212	5774
F6	5549	0	1984	12684
F7	2309	0	0	15659

### 5.10 Aceites esenciales utilizados

Estos AEs fueron adquiridos a través EUMA s.a.i.c.i y f., una empresa proveedora de aceites esenciales y fragancias que cumple con las disposiciones de ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) y las normas internacionales IFRA (*International Fragrance Association*).

*Abies alba* Mill. (Pinaceae) (Cod. 842), *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) (Cod. 519), *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae) (Cod. 758), *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) (Cod. 715), *Citrus bergamia* Risso & Poit (Rutaceae) (Cod. 048), *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (Rutaceae) (Cod. 154), *Cinnamomum cassia* (Nees & T.Nees) J.Presl (Lauraceae) (Cod. 774), *Cedrus sp.* (Pinaceae) (Cod. 471), *Citrus limonum* Risso (Rutaceae) (Cod. 047), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) W.Watson (Poaceae) (Cod. 580), *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson (Annonaceae) (Cod. 190); *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) (Cod. 723); *Cupressus sempervirens* L. (Cupressaceae) (Cod. 922); *Cinnamomum verum* J.Presl (Lauraceae) (Cod. 544); *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) (Cod. 162), *Eucaliptus globulus* Labill. (Myrtaceae) (Cod.495), *Foeniculum vulgare* Mill. (Apiaceae) (Cod. 666), *Juniperus communis* L. (Cupressaceae) (Cod. 515), *Juniperus virginiana* L. (Cupressaceae), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lamiaceae) (Cod.b510), *Litsea cubeba* (Lour.) Pers.

(Lauraceae) (Cod. 151), *Mentha arvensis* L. (Lamiaceae) (Cod. 200), *Myristica fragrans* Houtt. (Myristicaceae) (Cod. 644), *Melaleuca viridiflora* (Sol.) Gaertn. (Myrtaceae) (Cod. 289), *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) (Cod. 533), *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) (Cod. 533), *Pogostemon cablin* Benth. (Lamiaceae) (Cod. 217), *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W.Moore (Myrtaceae) (Cod. 867), *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae) (Cod.700), *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) (Cod. 241), *Vetiveria zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae) (Cod.178).

### 5.11 Generación de aceites esenciales modificados con bromo

Protocolo general: Se disolvió 1 g de aceite esencial en 50 mL de AcOEt. A esta solución agitada a  $-78^{\circ}\text{C}$  en una mezcla AcOEt y  $\text{N}_2$  líquido se le agregaron 375  $\mu\text{L}$  de  $\text{Br}_2$  por goteo. Luego, se mantuvo la solución en agitación a  $0^{\circ}\text{C}$  durante dos horas. Transcurrido este tiempo se finalizó la reacción por agregado de 10 mL de una solución de tiosulfato de sodio 10 %P/V. Se procedió a la separación de las fases acuosa y acetato de etilo. La fase acuosa fue extraída 3 veces con 10 mL de acetato de etilo. Los 30 mL producto de la extracción anterior se incorporaron a la primera fase orgánica. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtraron por gravedad y el solvente se evaporó a  $30^{\circ}\text{C}$  a presión reducida.

Observaciones: El protocolo utilizado para la bromación de aceites esenciales es idéntico al protocolo utilizado para la bromación de extractos metanólicos crudos (**Sección 5.6.1**), excepto por el solvente de reacción y el solvente de extracción: se utilizó diclorometano para extractos crudos y se utilizó acetato de etilo para los aceites esenciales. Esto se debe a que la reacción del bromo molecular con el ion  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (reactivo utilizado para eliminar el bromo excedente), produce a la vez el ion  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$  y el  $\text{HSO}_4^-$  con ion acompañante  $\text{Na}^+$ , puesto que dichos productos son muy solubles en agua se eliminan en el proceso de extracción líquido-líquido en el sistema Agua: DCM utilizado originalmente para la modificación de extractos. Pero además, en medio ácido el ion tiosulfato, bajo la forma de ácido tiosulfúrico  $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$  se dismuta obteniéndose azufre en su forma elemental (en distintas formas alotrópicas) y  $\text{SO}_2$ , entre otros productos minoritarios. El  $\text{SO}_2$  al ser volátil no presenta mayores problemas y suele ser eliminado durante los procesos de evaporación. En cambio hemos notado la presencia de S elemental en nuestros extractos vegetales modificados. Una de las formas de solucionar este problema, sería evitar la producción de S elemental disminuyendo la acidez del agua, reduciendo la cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelto en la misma. Otra

solución sería cambiar el solvente de reacción, por un solvente en cual el S elemental presente baja solubilidad. Dado que el DCM es uno de los mejores solventes de este elemento después del CS<sub>2</sub>, se decidió cambiar el solvente de reacción por acetato de etilo (AcOEt) manteniendo el resto de las condiciones establecidas previamente.

## **5.12 Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con bromo en solución**

### **5.12.1 Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados por RMN de <sup>1</sup>H**

Los espectros de aceites esenciales modificados y testigos fueron obtenidos a partir de soluciones de 40 mg/mL en CDCl<sub>3</sub> y con las siguientes consideraciones: tamaño *fid* 23.998; número de *scans* 64, ancho espectral 9,9956 ppm y tiempo de adquisición 3,99 segundos.

Los espectros de aceites esenciales modificados y testigos se compararon utilizando ACP, el mismo es un método no supervisado de análisis y sirve para reducir la dimensionalidad de datos. La utilización de este método permite maximizar la extracción de información a partir de la generación de nuevas variables denominadas CPs. Estos son creados por combinaciones lineales de las variables de partida, de manera tal que todos los CPs son ortogonales.

Con el objeto de realizar este análisis, inicialmente los espectros de RMN de <sup>1</sup>H fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> De esta manera los espectros son convertidos a un formato apropiado para su análisis multivariado usando el código escrito MATLAB (Versión 7).

El pre-procesamiento de los datos consistió en:

- ✓ Segmentación de los espectros en 1.958 porciones (*bins*) de 0,005 ppm (2,5 Hz) entre los desplazamientos de 0,20 ppm y 9,99 ppm.
- ✓ Remoción de las señales correspondientes al solvente (40 *bins* comprendidos entre 7,25 ppm y 7,27 ppm).
- ✓ Normalización de las áreas espectrales de los 1.958 *bins* restantes respecto al área espectral total (AET).
- ✓ Transformación logarítmica con el objeto de que las variables (*bins*) más pequeñas aumenten en interés respecto a las variables de mayor tamaño.

El resultado final del pre-procesamiento es una matriz de  $64 \times 1.958$  (número de espectros  $\times$  número de *bins* por espectro) a partir de la cual se realiza el análisis estadístico multivariado procesando los datos obtenidos a través de TOMCAT (*Toolbox for multivariate calibration technique*).<sup>131</sup> De esta manera se obtienen los descriptores (CPs), los cuales acumulan la varianza total de la población. Los gráficos de dispersión y loadings se realizaron utilizando las funciones graficas de MATLAB (Versión 7).

Para el análisis multivariado los espectros de RMN<sup>1</sup>H fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> Cada espectro fue segmentado en *bins*, se removieron las señales correspondientes al cloroformo, se normalizaron las áreas y transformaron logarítmicamente. El ACP de los datos pre-procesados se realizó utilizando el código de lectura MATLAB 6.5 (*Release 1.3*), TOMCAT.<sup>131</sup>

### ***5.12.2 Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales nativos y modificados con bromo por CG-EM***

#### **Condiciones cromatográficas**

Los cromatogramas de los aceites esenciales modificados y extractos testigos fueron obtenidos a partir de soluciones de 5 mg/mL en acetato de etilo. Las condiciones cromatográficas y de adquisición de espectros fueron las siguientes:

- ✓ Volumen de inyección: 1  $\mu$ L- Split: 1:10.
- ✓ Inyector: 250 °C.
- ✓ Temperatura de la columna: El programa de temperatura comienza a 60 °C se aumenta la temperatura hasta 280 °C con una velocidad de 3 °C/minuto y finalmente se aumenta la temperatura hasta 310 °C con una velocidad de 15°C/minuto.
- ✓ Tiempo total de corrida 75,33 minutos,
- ✓ Flujo He 1 mL/minuto

Detector: se analizaron todo los iones (full SCAN) con masas entre 50-500 UMA.

#### **Conteo de picos**

Para la obtención del número de picos de cada cromatograma, debido a la resolución cromatográfica, se realizó directamente la integración de los picos utilizando el método

integrador “agile” del programa MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis V. B.06.00 (Agilent Technologies, Inc 2012). Se consideraron en análisis posteriores solamente aquellos picos con un área de integración mayor al 0,1 % del pico de mayor área del cromatograma.

### Análisis estadístico descriptivo

Los resultados obtenidos en la etapa anterior se resumen en la **Tabla 26a** para AEs y AEBs por reacción de bromación en solución. Al igual que en la **Sección 5.8.2**, se calcularon los porcentajes que desaparecen (Ecuación 2), aparecen (Ecuación 3) y Bromados (Ecuación 5), son resumidos en la **Tabla 26b**.

Ecuación 5

$$\text{Bromados}(\%) = \frac{\text{AEB} - \text{Bromados}}{\text{AEB}} \times 100$$

**Tabla 26.** Datos resultantes del análisis de picos cromatográficos. **(a)** Número de picos detectados en aceites esenciales naturales y modificados con bromo en solución; picos alineados y picos conteniendo compuestos con perfil de susstitución isotópica de bromo. **(b)** Porcentaje de picos que desaparecen, aparecen y bromados luego de la reacción.

Especie vegetal de Partida	Número de picos <sup>a</sup>				Porcentaje de picos <sup>b</sup>		
	AE	No alterados	AEB	Bromados	Desaparecen en AE	Aparecen en AEB	Bromados
<i>A. absinthium</i>	54	4	110	90	92,59	96,36	84,91
<i>A. alba</i>	86	2	100	85	97,67	98,00	86,73
<i>A. Dracunculus</i>	26	2	45	39	92,31	95,56	90,70
<i>A. sativum</i>	35	15	82	56	57,14	81,71	83,58
<i>C. aurantium</i>	27	2	87	70	92,59	97,70	82,35
<i>C. bergamia</i>	30	5	137	95	83,33	96,35	71,97
<i>C. aurantifolia</i>	31	6	75	44	80,65	92,00	63,77
<i>C. cassia</i>	31	6	75	44	80,65	92,00	63,77
<i>Cedrus sp</i>	76	7	98	73	90,79	92,86	80,22
<i>C. limonum</i>	25	5	122	79	80,00	95,90	67,52
<i>C. martinii</i>	28	2	115	82	92,86	98,26	72,57
<i>C.odorata</i>	88	8	154	130	90,91	94,81	89,04
<i>C. sativum</i>	18	2	104	89	88,89	98,08	87,25
<i>C. sempervirens</i>	81	5	123	105	93,83	95,93	88,98
<i>C. verum</i>	37	5	62	52	86,49	91,94	91,23
<i>C. Citratus</i>	62	1	76	59	98,39	98,68	78,67
<i>E. globulus</i>	16	8	128	103	50,00	93,75	85,83

Especie vegetal de Partida	Número de picos <sup>a</sup>				Porcentaje de picos <sup>b</sup>		
	AE	No alterados	AEB	Bromados	Desaparecen en AE	Aparecen en AEB	Bromados
<i>F. vulgare</i>	23	10	176	150	56,52	94,32	90,36
<i>J. communis</i>	52	8	126	98	84,62	93,65	83,05
<i>J. virginiana</i>	86	10	143	101	88,37	93,01	75,94
<i>L. angustifolia</i>	64	3	76	63	95,31	96,05	86,30
<i>L. cubeba</i>	33	0	53	37	100,00	100,00	69,81
<i>M. arvensis</i>	66	4	122	85	93,94	96,72	72,03
<i>M. fragrans</i>	51	6	156	131	88,24	96,15	87,33
<i>M. viridiflora</i>	47	10	138	104	78,72	92,75	81,25
<i>O. basilicum</i>	26	1	76	67	96,15	98,68	89,33
<i>O. vulgare</i>	20	2	50	39	90,00	96,00	81,25
<i>P. cablin</i>	56	3	77	61	94,64	96,10	82,43
<i>P. racemosa</i>	62	7	74	51	88,71	90,54	76,12
<i>P. sylvestris</i>	32	11	127	92	65,63	91,34	79,31
<i>S. officinalis</i>	79	6	133	107	92,41	95,49	84,25
<i>V. zizanioides</i>	57	1	59	45	98,25	98,31	77,59

Además se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos correspondientes a la estadística descriptiva para cada conjunto de datos, utilizando el programa GraphPad Prism v 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los mismos se resumen en la **Tabla 27** para reacción de bromación con bromo en solución.

**Tabla 27.** Parámetros estadísticos obtenidos del cálculo de los porcentajes promedio de picos que desaparecen en los aceites esenciales (AEs) y aparecen en los aceites esenciales bromados (AEBs) para la reacción con bromo en solución y de estos cuales presentan patrón isotópico característico de compuesto bromado.

Parámetros estadísticos	Desaparecen en ET (%)	Aparecen en EMB (%)	Bromados (%)
Número de valores (n)	32	32	32
Mínimo	50,00	81,71	63,77
Percentil 25%	81,32	92,90	76,18
Mediana	90,40	95,92	82,39
Percentil 75%	93,91	97,46	87,12
Máximo	100,0	100,0	91,23
Media	86,19	94,96	81,19
Desviación estándar	12,61	3,454	7,219
Error estándar	2,229	0,6105	1,276

Parámetros estadísticos	Desaparecen en ET (%)	Aparecen en EMB (%)	Bromados (%)
Intervalo de confianza	(81,65; 90,74)	(93,71;96,20)	(78,59;83,79)

### **Análisis estadístico multivariado mediante ACP**

#### **Transformación de datos a formato tabular**

Los datos en bruto cromatogramas obtenidos por CG-EM (sin pre-tratamiento) contenidos en los mismos se transformaron a un formato tabular (información bidimensional). Para esta transformación se utilizó una técnica llamada *bucketing*. Para este análisis se utilizó el programa ProfileAnalysis v 2.00 (Bruker Daltonik GmbH), al igual que para extractos modificados.

#### Parámetros para generación de *buckets* y modelo de ACP:

Rango de  $t_R$  (minutos): 2-65

Rango de masas ( $m/z$ ): 50-500

*Bucketing* rectangular:  $\Delta t_R$  (minutos): 0,1;  $\Delta m/z$ : 10

Normalización: Respecto al *bucket* de mayor intensidad del conjunto de datos.

El resultado final fue una matriz de  $30 \times 920$  (número de cromatogramas  $\times$  número de *buckets* por cromatograma) a partir de la cual se realizó el ACP.

### 5.13 Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de *Foeniculum vulgare* L

Fraccionamiento por cromatografía en columna:

Se sometieron 1,063 g de aceite esencial de *F. vulgare* modificado con bromo en solución a CC sobre sílica gel eluyendo con gradiente de Hexano: AcOEt, desde hexano hasta Hexano:AcOEt (90:10). El gradiente se llevó a cabo aumentando en 1 % la proporción de AcOEt en la mezcla de FM en cada volumen de elución, se obtuvieron 14 fracciones (F1-F14). Cada una de las fracciones fueron evaporadas a 30°C a presión reducida, resuspendidas en DCM (10 mg/mL) y sembradas (10 µg) en un placa cromatográfica de sílica gel; la cuál se eluyó en un sistema de solvente Hexano:AcOEt (90:10). Posteriormente se le realizó el revelado autográfico enzimático para detección de inhibidores de tirosinasa (**Sección 5.18.3**), donde se observó que la fracción F8 contenía el compuesto activo.

La muestra F8 resultó ser un sólido amorfo blanco amarillento, el cuál fue identificado como 2-Bromo-1-(4-metoxifenil) propan-1-ona (compuesto **1**), C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>2</sub>; PM= 243,10.

El compuesto **1** se solubilizó en CDCl<sub>3</sub> y se analizó por RMN, EMAR (infusión directa) y CG-EM (Condiciones en sección 5.12.2) obteniéndose la siguiente información:

<sup>1</sup>H RMN δ<sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) 8,01 (d, *J*= 8 Hz, 2H, Ar-H); 6,95 (d, *J*= 8 Hz, 2H, Ar-H); 5,26 (q, *J*= 7 HZ, 1H, CHBr); 3,88 (s, 3H, Ar-OCH<sub>3</sub>); 1,88 (d, *J*=7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C RMN δ<sub>C</sub> (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 192,0 (C=O); 164,0(Ar cuat.); 131,3 (Ar-H); 126,1(Ar cuat.); 114,0 (Ar-H); 55,6 (Ar-OCH<sub>3</sub>); 41,5 (CHBr); 20,2 (CH<sub>3</sub>).

GC-EM: t<sub>R</sub>= 34,3 minutos; [M<sup>+</sup>] (porcentajes relativos al patrón isotópico de bromo) *m/z* = 242,0 (100,0 %), 244,00 (97,3 %), 243,00 (11,0 %), 245,00 (10,8 %); fragmentación (porcentajes relativos a la abundancia total de fragmentos) pico base *m/z* = 135,0; fragmentos abundantes *m/z*= 164,10 (1,18 %), 162,10 (0,95 %), 107,10 (10,63 %), 92,0 (9,52 %), 77,10 (12,21 %), 64,0 (4,23 %).

EMAR (infusión directa): iones positivos; [M+H] requerido *m/z* 243,0015, [M+H] encontrado *m/z* 243,0013 (error 0,8 ppm); [M+Na] requerido *m/z* 264,9835, [M+Na] encontrado *m/z* 264,9830 (error 1,6 ppm).

**Síntesis de compuesto 1 a partir de anetol**

Se disolvió (E)-1-metoxi-4-(prop-1-en-1-il) benceno (600 mg, 4 mmol) en 30 mL de AcOEt, mantenidos a  $-78^{\circ}\text{C}$  en una mezcla AcOEt y  $\text{N}_2$  líquido, se le incorporó el  $\text{Br}_2$  líquido por goteo (230  $\mu\text{L}$ , 4,45 mmol, 1,1 equiv; reactivo en exceso). Luego, se mantuvo la reacción en agitación a  $0^{\circ}\text{C}$  durante dos horas. Transcurrido este tiempo se finalizó la reacción por agregado de 60 mL de una solución de tiosulfato de sodio 10 % P/V. Se procedió a la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa fue extraída 3 veces con 30 mL de AcOEt. Los 90 mL producto de la extracción anterior se incorporaron a la primera fase orgánica obtenida y la fase orgánica resultante se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a  $30^{\circ}\text{C}$  a presión reducida. El crudo de reacción obtenido (1,09 g) fue fraccionado por CC sobre sílica gel eluyendo con gradiente de hexano: AcOEt, desde hexano hasta hexano:AcOEt (90:10). El gradiente se llevó a cabo aumentando en 1% la proporción de AcOEt en cada volumen de elución. Se obtuvieron 37 mg del compuesto **1** (3,9 % de rendimiento).

**Síntesis del compuesto 1 a partir de 1-(4-metoxifenil) propan-1-ona**

A una solución de 1-(4-metoxifenil) propan-1-ona (540 mg, 3,16 mmol) en AcOEt (30 mL), mantenida en agitación a  $-78^{\circ}\text{C}$ , se le agregó  $\text{Br}_2$  (185  $\mu\text{L}$ , 3,60 mmol, 1,1 equiv.; reactivo en exceso) por goteo y posteriormente se mantuvo la agitación a  $0^{\circ}\text{C}$  durante dos horas. Transcurrido este tiempo se finalizó la reacción por agregado de 60 mL de una solución de tiosulfato de sodio 10 % P/V. Se procedió a la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa fue extraída 3 veces con 30 mL de AcOEt. Los 90 mL producto de la extracción anterior se incorporaron a la primera fase obtenida, se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtró por gravedad y el solvente se evaporó a  $30^{\circ}\text{C}$  a presión reducida. El crudo de reacción (858 mg) fue fraccionado por CC sobre sílica gel eluyendo con gradiente de hexano: AcOEt, desde hexano hasta hexano:AcOEt (90:10). El gradiente se llevó a cabo aumentando en 1 % la proporción de AcOEt en cada volumen de elución. Se obtuvieron 384 mg del compuesto **1** (48 % de rendimiento).

**5.13.1 Análisis mediante BIOMSID****Preparación de la muestra.**

Se sembraron en 3 placas de CCD, 5  $\mu\text{L}$  of AEB of *F. Vulgare* de 40 mg/mL, las cuales fueron eluidas en tres fases móviles distintas: DCM (100), hexano:AcOEt (80:20) y tolueno:

AcOEt (93:7). A cada una de estas placas se les realizó el ensayo para detección de inhibidores de XO (**Sección 5.18.6**) y muestras del agar del halo de inhibición y del fondo coloreado fueron extraídas utilizando como cortante un tubo de vidrio de 0,5 cm de diámetro. Cada porción de gel fue extraída con DCM (3 x 1 mL) y las soluciones resultantes fueron a 30°C a presión reducida. Las soluciones provenientes de cada muestra fueron resuspendidas en metanol y se inyectaron de forma directa en la cámara de ionización por electrospray a una velocidad de 180  $\mu\text{L min}^{-1}$  durante 1 minuto para el análisis por EMAR. Los espectros fueron pre- procesados, corrigiendo la línea de base y exportados en formato ASCII utilizando el programa Data Analysis Version 4.0 SP1 (Bruker Daltonik GmbH). Las listas de masas, fueron generadas utilizando el algoritmo *Peak finder Apex* de Data Analysis Version 4.0 SP1, constituidas por los valores de  $m/z$  y su respectivos valores de intensidad. Los parámetros utilizados fueron: *peak width* (FWHM) = 0,04, *S/N threshold* = 6,5, *Relative intensity threshold* (Base peak) = 0, *Absolute intensity threshold* = 0.

#### **Parámetros utilizados para BIOMSID:**

En todos los procesos de comparación de espectros espectros, el parámetro “tolerancia” fue establecido en 0,0005 de  $m/z$ . Este valor permite la validación de fórmulas moleculares por EMAR con un error que es inferior al usualmente aceptado por moléculas con peso molecular de 300 o mayor (error=1,66 ppm). El algoritmo BIOMSID fue corrido en MATLAB environment (R2013a 8.1.0.604). Los espectros fueron filtrados a una intensidad umbral de 1000 con el objetivo de eliminar pequeñas señales de ruido. Entonces, los espectros correspondientes al fondo coloreado fueron sustraídos de los espectros correspondientes a los halos de inhibición de cada muestra. De esta forma, se filtran señales que no están relacionadas con la actividad inhibitoria (Buffer fosfato, xantina, NBT, TEMED). Finalmente, todos los espectros sustraídos son comparados para buscar la señal común a las 3 CCDs relacionada con el inhibidor.

### ***5.14 Aislamiento bioguiado del aceite esencial modificado con bromo de Artemisia dracunculus L.***

Fraccionamiento por cromatografía en columna:

Se sometieron 1,337 g de aceite esencial bromado en solución a CC sobre silica gel eluyendo con gradiente de Hexano: AcOEt, desde hexano hasta hexano:AcOEt (90:10). El gradiente se llevó a cabo aumentando en 0,5 % la proporción de AcOEt en la mezcla de FM

en cada volumen de elución, se obtuvieron 10 fracciones (F1-F10). Cada una de las fracciones fueron evaporadas a 30°C a presión reducida, resuspendidas en DCM (10 mg/mL) y sembradas (10 µg) en un placa cromatográfica de sílica gel; la cuál se eluyó en un sistema de solvente hexano:AcOEt 90:10. Posteriormente se le realizó el revelado autográfico enzimático para detección de inhibidores de acetilcolinesterasa (**Sección 5.18.4**), resultando activas las fracciones F3 (215 mg), F4 (101 mg) y F5 (151,2 mg). En la fracción F3 se observó el halo de inhibición de mayor  $R_f$  ( $R_f=0,52$ ), en la fracción F4 no se logró resolución cromatográfica por lo que aparecieron los dos halos de inhibición y en la fracción F5 se observó el halo de inhibición de menor  $R_f$  ( $R_f=0,43$ ).

La fracción F3 resultó ser un aceite incoloro, el cuál fue identificado como 1-(2,3-dibromopropil)-4-metoxibenzeno (compuesto **2**),  $C_{10}H_{12}Br_2O$ ; PM= 308,01.

El compuesto **2** se solubilizó en  $CDCl_3$  y se analizó por RMN y GC-MS (Condiciones en **Sección 5.12.2**) obteniéndose la siguiente información:

$^1H$  RMN  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz) 7,21 (d,  $J= 8,7$  Hz, 2H, Ar-H); 6,87 (d,  $J= 8,7$  Hz, 2H, Ar-H); 4,32 (m, sistema ABX, 1H, CHBr); 3,81 (s, 3H, Ar-OCH<sub>3</sub>); 3,81 (dd,  $^2J= 10,4$  Hz,  $^3J= 4,2$  Hz, sistema ABX, 1H, CH<sub>2</sub>Br); 3,61 (dd,  $^2J= 10,4$  Hz,  $^3J= 8,9$  Hz, sistema ABX, 1H, CH<sub>2</sub>Br); 3,41 (dd,  $^2J= 14,6$  Hz,  $^3J= 4,9$  Hz, sistema ABX, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>); 3,10 (dd,  $^2J= 14,6$  Hz,  $^3J= 7,5$  Hz, sistema ABX, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>).

$^{13}C$  RMN  $\delta_C$  (75 MHz;  $CDCl_3$ ) 158,8 (Ar cuat.); 130,6 (Ar-H); 128,7 (Ar cuat.); 113,9 (Ar-H); 55,2 (Ar-OCH<sub>3</sub>); 52,9 (CHBr); 41,0 (Ar-CH<sub>2</sub>); 35,9 (CH<sub>2</sub>Br).

GC-EM:  $t_R= 39,4$  minutos;  $[M^+]$  (porcentajes relativos al patrón isotópico de bromo)  $m/z= 307,90$  (100,0 %), 305,90 (51,4 %), 309,90 (48,6 %), 308,90 (11,0 %), 307,00 (5,6 %), 310,90 (5,3 %); fragmentación (porcentajes relativos a la abundancia total de fragmentos) pico base  $m/z = 134,10$  (100 %); fragmentos abundantes  $m/z= 229,00$  (9,61%), 227,00 (9,64 %), 215,00 (91,57 %), 213,00 (93,37 %), 147,10 (7,67 %), 121,10 (16,76 %), 103,10 (4,52 %), 91,10 (9,02 %), 77,10 (5,66 %), 65,10 (3,54 %).

La fracción F5 también resultó ser un aceite incoloro, el cuál fue identificado como 1-(1,3-dibromopropan-2-il)-4-metoxibenzeno (compuesto **3**),  $C_{10}H_{12}Br_2O$ ; PM= 308,01.

El compuesto **3** se solubilizó en  $CDCl_3$  y se analizó por RMN y GC-MS obteniéndose la siguiente información

$^1\text{H}$  RMN  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) 7,15 (d,  $J= 8,8$  Hz, 2H, Ar-H); 6,89 (d,  $J= 8,8$  Hz, 2H, Ar-H); 3,80 (s, 3H, Ar-OCH<sub>3</sub>); 3,72 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>Br); 3,33 (q, 1H, CH).

$^{13}\text{C}$  RMN  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) 159,2 (Ar cuat.); 131,6 (Ar-H); 128,6 (Ar cuat.); 114,1 (Ar-H); 55,2 (Ar-OCH<sub>3</sub>); 48,2 (Ar-CH); 35,8 (CH<sub>2</sub>Br).

GCEM:  $t_{\text{R}}= 38,2$  minutos;  $[\text{M}^+]$  (porcentajes relativos al patrón de isotópico de bromo)  $m/z= 307,90$  (100,0 %), 305,90 (51,4 %), 309,90 (48,6 %), 308,90 (11,0 %), 307,00 (5,6 %), 310,90 (5,3 %); fragmentación (porcentajes relativos a la abundancia del pico base) pico base  $m/z = 121,10$  (100 %); fragmentos abundantes  $m/z= 229,00$  (3,40 %), 227,00 (3,41 %), 147,10 (5,62 %), 103,10 (2,40 %), 91,10 (3,95 %), 77,00 (4,44 %).

### **5.15 Generación de aceites esenciales modificados con flúor**

Protocolo general: A una solución de aceite esencial (125 mg) en acetonitrilo (10 mL), se le añadió Selectfluor® (325 mg) y la mezcla resultante se agitó y a reflujo durante 16 h. Luego de este período de tiempo, el disolvente se evaporó a 30 °C a presión reducida. La mezcla de reacción se resuspendió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Las fases de acetato de etilo reunidas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro) y se filtraron por gravedad y el solvente se evaporó a 30°C a presión reducida.

### **5.16 Análisis de cambios en la composición química de aceites esenciales modificados con flúor**

#### **5.16.1 Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados por RMN de $^1\text{H}$**

Los espectros de aceites esenciales modificados y testigos fueron obtenidos a partir de soluciones de 40 mg/mL en  $\text{CDCl}_3$  y con las siguientes consideraciones: tamaño *fid* 23.998; número de *scans* 64, ancho espectral 9,9956 ppm y tiempo de adquisición 3,99 segundos.

Los espectros de aceites esenciales modificados y testigos se compararon utilizando ACP, el mismo es un método no supervisado de análisis y sirve para reducir la dimensionalidad de datos. La utilización de este método permite maximizar la extracción de información a partir de la generación de nuevas variables denominadas CPs. Estos son creados por combinaciones lineales de las variables de partida, de manera tal que todos los CPs son ortogonales.

Con el objeto de realizar este análisis, inicialmente los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> De esta manera los espectros son convertidos a un formato apropiado para su análisis multivariado usando el código escrito MATLAB (Versión 7).

El pre-procesamiento de los datos consistió en:

- ✓ Segmentación de los espectros en 1.958 porciones (*bins*) de 0,005 ppm (2,5 Hz) entre los desplazamientos de 0,20 ppm y 10 ppm.
- ✓ Remoción de las señales correspondientes al solvente (40 *bins* comprendidos entre 7,25 ppm y 7,27 ppm).
- ✓ Normalización de las áreas espectrales de los 1.958 *bins* restantes respecto al área espectral total (AET).
- ✓ Transformación logarítmica con el objeto de que las variables (*bins*) más pequeñas aumenten en interés respecto a las variables de mayor tamaño.

El resultado final del pre-procesamiento es una matriz de  $24 \times 1.958$  (número de espectros  $\times$  número de *bins* por espectro) a partir de la cual se realiza el análisis estadístico multivariado procesando los datos obtenidos a través de TOMCAT (*Toolbox for multivariate calibration technique*).<sup>131</sup> De esta manera se obtienen los descriptores (CPs), los cuales acumulan la varianza total de la población. Los gráficos de dispersión y loadings se realizaron utilizando las funciones gráficas de MATLAB (Versión 7).

Para el análisis multivariado los espectros de RMN $^1\text{H}$  fueron pre-procesados usando el programa ProMetab.<sup>130</sup> Cada espectro fue segmentado en *bins*, se removieron las señales correspondientes al cloroformo, se normalizaron las áreas y transformaron logarítmicamente. El ACP de los datos pre-procesados se realizó utilizando el código de lectura MATLAB (Versión 7), TOMCAT.<sup>131</sup>

### ***5.16.2 Comparación de las composiciones químicas de aceites esenciales naturales y modificados con flúor por CG-EM***

#### **Condiciones cromatográficas**

Los cromatogramas de los aceites esenciales modificados y de los aceites esenciales de partida fueron obtenidos a partir de soluciones de 5 mg/mL en acetato de etilo. Las condiciones cromatográficas y de adquisición de espectros fueron las siguientes:

- ✓ Volumen de inyección: 1  $\mu$ L- Split: 1:10.
- ✓ Inyector: 250 °C.
- ✓ Temperatura de la columna: El programa de temperatura comienza a 60 °C se aumenta la temperatura hasta 280 °C con una velocidad de 3 °C/minuto y finalmente se aumenta la temperatura hasta 310 °C con una velocidad de 15 °C/minuto.
- ✓ Tiempo total de corrida 75,33 minutos,
- ✓ Flujo He 1 mL/minuto

Detector: se analizaron todo los iones (full SCAN) con masas entre 50-500 UMA.

### Conteo de picos

Para la obtención del número de picos de cada cromatograma, debido a la resolución cromatográfica, se realizó directamente la integración de los picos utilizando el método integrador “agile” del programa MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis V. B.06.00 (Agilent Technologies, Inc 2012). Se consideraron en análisis posteriores solamente aquellos picos con un área de integración mayor al 0,1 % del pico de mayor área del cromatograma.

### Análisis estadístico descriptivo

Los resultados obtenidos en la etapa anterior se resumen en la **Tabla 28a** para AEs y AEFs por reacción de bromación en solución. Al igual que en la **Sección 5.12.2**, se calcularon los porcentajes que desaparecen (Ecuación 2), aparecen (Ecuación 3), son resumidos en la **Tabla 28b**.

**Tabla 28.** Datos resultantes del análisis de picos cromatográficos. (a) Número de picos detectados en aceites esenciales nativos y modificados con SelectFluor; picos no alterados (b) Porcentaje de picos que desaparecen y aparecen luego de la reacción.

Especie vegetal de partida	Número de picos			Porcentaje de picos	
	AE	No alterados	AEF	Desaparecen en AE	Aparecen en AEF
<i>A. dracuncululus</i>	16	1	132	93,75	99,24
<i>C. bergamia</i>	30	1	164	96,67	99,39
<i>C. limonum</i>	25	1	177	96,00	99,44
<i>C. sativum</i>	18	2	111	88,89	98,20
<i>C. sempervirens</i>	81	4	196	95,06	97,96

Especie vegetal de partida	Número de picos			Porcentaje de picos	
	AE	No alterados	AEF	Desaparecen en AE	Aparecen en AEF
<i>C. verum</i>	37	10	83	72,97	87,95
<i>E. globulus</i>	16	1	182	93,75	99,45
<i>F. vulgare</i>	16	6	151	62,50	96,03
<i>L. angustifolia</i>	64	10	132	84,38	92,42
<i>M. arvensis</i>	66	7	184	89,39	96,20
<i>M. fragrans</i>	51	4	208	92,16	98,08
<i>O. basilicum</i>	26	4	138	84,62	97,10

Además se realizó el cálculo de los parámetros estadísticos correspondientes a la estadística descriptiva para cada conjunto de datos, utilizando el programa GraphPad Prism v 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Los mismos se resumen en la **Tabla 29** para reacción de fluoración con SelectFluor.

**Tabla 29.** Parámetros estadísticos obtenidos del cálculo de los porcentajes promedio de picos que desaparecen en los aceites esenciales (AEs) y aparecen en los aceites esenciales fluorados (AEFs) debido a la reacción de fluoración.

Parámetros estadísticos	Desaparecen en AEs (%)	Aparecen en AEFs (%)
Número de valores (n)	12	12
Mínimo	62,5	87,95
Percentil 25%	84,44	96,07
Mediana	90,78	98,02
Percentil 75%	94,73	99,35
Máximo	96,67	99,45
Media	87,51	96,79
Desviación estándar	10,33	3,44
Error estándar	2,981	0,993
Intervalo de confianza	(80,95;94,07)	(94,60; 98,97)

## **Análisis estadístico multivariado mediante ACP**

### **Transformación de datos a formato tabular**

Los datos en bruto cromatogramas obtenidos por CG-EM (sin pre-tratamiento) contenidos en los mismos se transformaron a un formato tabular (información bidimensional). Para esta transformación se utilizó una técnica llamada *bucketing*. Para este análisis se utilizó el programa ProfileAnalysis v 2.00 (Bruker Daltonik GmbH), al igual que para extractos modificados.

#### Parámetros para generación de *buckets* y modelo de ACP:

Rango de  $t_R$  (minutos): 2-65

Rango de masas ( $m/z$ ): 50-500

*Bucketing* rectangular:  $\Delta t_R$  (minutos): 0,1;  $\Delta m/z$ : 10

Normalización: Respecto al *bucket* de mayor intensidad del conjunto de datos.

El resultado final fue una matriz de  $30 \times 920$  (número de cromatogramas  $\times$  número de *buckets* por cromatograma) a partir de la cual se realizó el ACP.

## ***5.17 Aislamiento bioguiado de compuestos activos presentes en los aceites esenciales fluorados de Artemisia dracunculus L. y Ocimum basilicum L***

### **Síntesis de compuestos activos a partir de 1-alil-4-metoxibenceno**

A una solución de 1-alil-4-metoxibenceno (1 g) en acetonitrilo (80 mL), se le añadió Selectfluor® (2,6 g) y la mezcla resultante se agitó a reflujo durante 16 h. Luego de este período de tiempo, el disolvente se evaporó a 30°C a presión reducida. La mezcla de reacción se resuspendió en una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 80 mL). Las fases de acetato de etilo reunidas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtraron por gravedad, y el solvente se evaporó a 30°C a presión reducida. Se obtuvieron 1,112 g de crudo de reacción que se sometieron a cromatografía en columna sobre sílica gel eluyendo con gradiente de hexano: AcOEt, desde hexano hasta hexano:AcOEt (90:10). El gradiente se llevó a cabo aumentando en 0,5 % la proporción de AcOEt en la mezcla en cada volumen de elución y se obtuvieron 10 fracciones (F1-F10). Cada una de las fracciones fueron evaporadas a 30 °C a presión reducida, resuspendidas en DCM (10 mg/mL)

y sembradas (10 µg) en un placa cromatográfica de sílica gel; la cuál se eluyó en un sistema de solvente Hexano:AcOEt (90:10). Posteriormente se le realizó el revelado autográfico enzimático para detección de inhibidores de tirosinasa (**Sección 5.18.3**), resultando activas las fracciones F2 (220 mg), F3 (115 mg) y F5 (16 mg).

La muestra F2 (líquido incoloro) resultó ser un el compuesto 1-alil-2-fluoro-4-metoxibenceno (compuesto **4**), C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>OF; PM= 166,19. Se obtuvieron 220 mg (19,62 % de rendimiento).

<sup>1</sup>H RMN δ<sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) 6,86 (m, 2H, H3 y H6); 6,76 (m, 1H, H5); 5,96 (m, 1H, =CH); 5,07 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); δ = 3,80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); δ = 3,36 (d, J=6,6 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C RMN δ<sub>C</sub> (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 157,0 (d, J=237,8 Hz, C2), 153,4 (d, J=27,9 Hz, C4); 136,1 (=CH); 130,4 (d, J=7,1 Hz, C1); 116,5 (d, J=23,2 Hz, C6); 116,1 (=CH<sub>2</sub>); 112,8 (d, J=22,7 Hz, C3); 111,1 (d, J=8,3 Hz, C5); 55,9 (-OCH<sub>3</sub>); 34,0 (-CH<sub>2</sub>).

<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>F</sub> = -124,30 (m, 1F)

GC-EM: t<sub>R</sub> = 15,8 minutos; [M<sup>+</sup>] m/z = 166,1; fragmentación: pico base m/z = 166,1 (100%); fragmentos abundantes m/z= 151,10 (38,00 %), 139,1 (27,00 %), 135,1 (47,00 %), 103,1 (20,00%), 96,0 (6,81%), 77,00 (11,21%).

EMAR (infusión directa): ión positivo; [M+Na] requerido m/z 189,0686, [M+Na] encontrado m/z 189,0686 (error 0,3 ppm).

La muestra F3 (líquido incoloro) resultó ser 4-alil-2-fluoro-1-metoxibenceno (compuesto **5**), C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>OF; PM= 166,19. Se obtuvieron 115 mg (10,25 % de rendimiento).

<sup>1</sup>H RMN δ<sub>H</sub> (CDCl<sub>3</sub>; 300 MHz) 6,92 (m, 1H, H6); 6,88 (m, 2H, H3 y H5); 5,92 (m, 1H, =CH); 5,06 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>); δ = 3,86 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); δ = 3,31 (d, J=6,6 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C RMN δ<sub>C</sub> (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 152,3 (d, J=245,3 Hz, C2), 145,8 (C1); 137,0 (=CH); 133,2 (d, J=3,4 Hz, C4); 123,9 (d, J=3,43 Hz, C5); 116,1 (=CH<sub>2</sub>); 116,5 (d, J=18,1 Hz, C3); 113,5 (d, J=3,4 Hz, C6); 56,4 (-OCH<sub>3</sub>); 39,2 (-CH<sub>2</sub>).

<sup>19</sup>F NMR (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>F</sub> = -135,5 (m, 1F)

GC-EM: t<sub>R</sub> = 15,7 minutos; [M<sup>+</sup>] m/z = 166,1; fragmentación: pico base m/z = 166,1 (100 %); fragmentos abundantes m/z= 152,10 (43,44 %), 139,1 (23,00 %), 135,1 (44,79 %), 109,1 (21,96 %), 103,1 (21,55 %), 96,0 (6,81 %), 77,00 (13,91 %).

EMAR (infusión directa): ión positivo; [M+Na] requerido  $m/z$  189,0686, [M+Na] encontrado  $m/z$  189,0688 (error -1,2 ppm).

La muestra F5 (líquido amarillento) fue identificada como 4-alil-4-fluorociclohexa-2,5-dienona (compuesto **6**),  $C_9H_9OF$ ; PM= 152,17. Se obtuvieron 220 mg (1,56 % de rendimiento).

$^1H$  RMN  $\delta_H$  ( $CDCl_3$ ; 300 MHz) 6,88 (dd,  $J=10/6$  Hz, 2H); 6,24 (d,  $J=10$  Hz, 2H); 5,70 (m, 1H); 5,18 (m, 2H);  $\delta = 2,64$  (dd,  $J=16/8$  Hz, 2H).

$^{13}C$  RMN  $\delta_C$  (75 MHz;  $CDCl_3$ ) 184,8 (d,  $J=5,48$  Hz, C1); 145,5 (d,  $J=21,28$  Hz, C3 y C5); 129,6 (d,  $J=6,53$  Hz, =CH); 129,5 (d,  $J=8,26$  Hz, C2 y C6); 121,0 (=CH<sub>2</sub>); 88,3 (d,  $J=166$  Hz, C4);  $\delta = 43,3$  (d,  $J=26$  Hz, -CH<sub>2</sub>-).

$^{19}F$  NMR (282 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta = -150,90$  (m, 1F)

GC-EM:  $t_R = 10,8$  minutos;  $[M^+]$   $m/z = 152,1$ ; fragmentación: pico base  $m/z = 137,0$  (100%); fragmentos abundantes  $m/z = 152,10$  (47,44 %), 134,1 (49,51 %), 124,0 (15,80 %), 112,0 (73,88 %), 105,1 (18,31 %), 83,0 (76,50 %).

EMAR (infusión directa): ión positivo; [M+Na] requerido  $m/z$  175,0530, [M+Na] encontrado  $m/z$  175,0530 (error 0,2 ppm).

### ***5.18 Comparación de cambios en las propiedades biomoleculares de los extractos y aceites esenciales modificados***

Las muestras a analizar se sembraron sobre las placas de CCD de fase normal en siembras de 200  $\mu g/0,4$  cm. Una vez desarrolladas, las placas se dejaron secar bajo corriente de aire a temperatura ambiente para eliminar restos de solvente que pudieran afectar los ensayos biológicos. Los protocolos explicados a continuación para las bioautografías están ajustados a placas de 10 x 10 cm de superficie.

#### ***5.18.1 Detección de compuestos antioxidantes captadores de DPPH***

##### **Solución reveladora**

Solución de DPPH (0,4mg/mL): Se calculo 3 mL por placa de solución.

**Procedimiento general:** La solución de DPPH se roció hasta saturación sobre las placas cromatográficas. Inmediatamente después del rociado las mismas se situaron bajo corriente de aire para eliminar el etanol y evitar la desorción de los compuestos del CCD por

eventuales gotas que quedaran sobre la superficie. La lectura del ensayo se realizó a los 30 minutos.

### 5.18.2 *Detección de compuestos antioxidantes captadores de anión superóxido*

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer fosfato (KHPO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 50 mM; pH 8,00: Se disolvieron 34,84 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 800 mL de agua destilada, el pH de la solución se ajustó a 8,00 con HCl 0,1N y el volumen de la solución se llevó a 1000 mL con agua destilada. Se le realizó a la solución anterior un dilución 1:4 con agua destilada. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de EDTA (10 mM): 380 mg de EDTA se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de NBT (5,58 mg/ml): 558 mg de NBT se disolvieron en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2 °C.

Solución de riboflavina (3,75 mg/mL): 375 mg de riboflavina se suspendieron en 100 mL de agua destilada. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2 °C.

**Procedimiento general:** 0,175 g de agar se disolvieron a 80 °C en una mezcla compuesta por 14,3 mL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM, 1,8 mL de solución de EDTA 10 mM. La solución resultante se enfrió hasta 55 °C. A esta temperatura se agregaron 750 µL de solución de NBT 5,58 mg/mL mezclando por inversión suave. Se dejó enfriar la solución hasta 50 °C y 63 µL de suspensión de riboflavina 3,75 mg/mL y 35 µL de TEMED mezclando nuevamente por inversión suave.

### 5.18.3 *Actividad inhibitoria tirosinasa*

#### **Soluciones de trabajo:**

Solución de enzima tirosinasa: Se suspendieron 10 mg de liofilizado de enzima (1,881 U/mg) en 10 mL de buffer fosfato 20 mM pH 6,8 y luego se llevó la solución a 10 mL con el mismo buffer (concentración final 1,881 U/mL).

Solución de L- tirosina: Se disolvieron 10 mg de L-tirosina en un volumen final de 10 mL de buffer fosfato 20 mM, pH 6,8 (Concentración final 2,5 mM).

Gel de agar: Se disolvieron 12 g de agar en un volumen final de 100 mL de buffer fosfato 20 mM de pH 6,8 (concentración final 1,2 % P/V). La solución se llevó hasta 80 °C y se dejó enfriar hasta 35°C.

**Procedimiento general:** A 7,2 mL de una solución de agar de 1,2 % P/V a 35 °C, se le agregaron 186 µL de la solución de enzima (1881 U/mL) la mezcla se homogenizó cuidadosamente por inversión. Luego se le agregan 1,8 mL de la solución de sustrato (2,5 mM). Esta solución se vertió sobre la placa cromatográfica y se llevó a 20 °C, temperatura a la que las placas son incubadas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (20 min) las placas fueron fotografiadas bajo luz visible.

#### **5.18.4 Actividad inhibitoria acetilcolinesterasa**

##### **Soluciones de trabajo:**

Buffer fosfato Tris-HCl; 50mM; pH 8,00: 6,06 g de Tris-HCl se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se ajustó a pH 8,00 con HCl 0,1N y se llevó a volumen de 1000 mL con agua destilada. Se almacenó a -20 °C.

Solución de acetato de naftilo (2,5 mg/mL): 7,5 mg de acetato de naftilo se disolvieron en 3mL de etanol. La solución se preparó antes de usar.

Solución de AchE para inmovilización en gel 132 U/mL: 300 U de AChE se disolvieron en 10 mL de Tris-HCl (pH 8,00). La solución se almacenó a -20 °C.

Solucion de *Fast blue B* (2,5 mg/mL): 30 mg de *Fast blue B* se disolvieron en 12 mL de agua destilada. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

**Procedimiento general:** La placa fue rociada sucesivamente con 5,0 mL de una mezcla 4:1 de solución de sal *fast blue B* (2,5 mg/mL en agua destilada) y solución de acetato de 1-naftilo (2,5 mg/mL en etanol). Posteriormente, se disolvieron 87,5 mg de agar a 80 °C en 8,2 mL de solución de buffer tris (0,05 M, pH=7,80). La solución resultante se dejó enfriar hasta 45°C y a esa temperatura se agregaron 218,5 µL de solución de enzima (60 U/mL) y se mezcló por inversión suave. Dicha solución se distribuyó uniformemente sobre la placa cromatográfica seca de manera de cubrir toda la superficie. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica fue incubada en una caja de Petri durante 20 minutos a 37°C.

### 5.18.5 Actividad inhibitoria $\beta$ -glucosidasa

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer acetato de sodio 100 mM; pH 5,00: Se disolvieron 15 g de acetato de sodio en 800 mL de agua destilada, se ajustó a pH 5,00 con aproximadamente 2 mL de ácido acético glacial y se llevó a volumen con agua destilada. La solución se almacenó a 2°C.

Solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (5 % P/V): Se disolvieron 5 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de buffer de acetato de sodio (pH 5,00) 100 mM. La solución se preparó siempre momentos antes de ser utilizada.

Solución de esculina (0,2 mg/ml): Se sonicaron 160 mg de esculina hasta disolución en 80 mL de buffer de acetato de sodio (pH 5,00) 100 mM. La solución se preparó momentos antes de ser utilizada.

Solución de  $\beta$ -glucosidasa (2,5 U/mL): Se disolvieron 25 U de  $\beta$ -glucosidasa en 10 mL de buffer AcONa (pH 5,00) 100 mM. La solución se almacenó refrigerada a 2°C.

**Procedimiento general:** Se disolvieron 52,5 mg de agar a 80°C en 7,5 mL de solución de buffer acetato de sodio/ácido acético. La solución resultante se dejó enfriar hasta 45°C y a esta temperatura se agregaron 0,9 mL de solución de cloruro férrico (0,5% P/V en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,1 M) y 25  $\mu\text{L}$  de solución de enzima (2,5 U/mL en buffer acetato de sodio/ácido acético 0,1 M) mezclando por inversión suave. La solución resultante se distribuyó uniformemente sobre toda la superficie de la placa cromatográfica. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica se incubó durante 120 minutos a 37°C y posteriormente se sumergió en una solución conteniendo esculina (0,2% P/V en buffer acetato 0,1 M) a 37°C durante 120 minutos. Los cambios en coloración fueron analizados visualmente.

### 5.18.6 Actividad inhibitoria de xantina oxidasa

#### **Soluciones de trabajo:**

Buffer fosfato ( $\text{KHPO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$ ) 50 mM; pH 8,00: Se disolvieron 34,84 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en 800 mL de agua destilada, el pH de la solución se ajustó a 8,00 con HCl 0,1 N y el volumen de la solución se llevó a 1000 mL con agua destilada. Se le realizó a la solución anterior un dilución 1:4 con agua destilada. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de EDTA (10 mM): Se disolvieron 380 mg de EDTA en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50mM. La solución se almacenó a 2 °C.

Solución de NBT (5,58 mg/ml): Se disolvieron 558mg de NBT en 100 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución se almacenó en la oscuridad y refrigerada a 2°C.

Solución de xantina (1,5 mM): 22,8 mg de xantina se agregaron a 50mL de buffer fosfato (pH 8,00) 50 mM en ebullición. La mezcla se dejó en ebullición hasta disolución completa de la xantina y se diluyó con 50 mL de buffer fosfato (pH 7,90) 50 mM. La solución de xantina se preparó momentos antes de usarse.

Solución de XO (5 U/mL): Se diluyeron 27,5 µL de XO 36,4 U/mL en 200 µL de buffer fosfato (pH 8,00) 200 mM.

**Procedimiento general:** Se disolvieron 85,0 mg de agar a 80°C en una mezcla de EDTA 10 mM (0,9 mL), buffer fosfato 200 mM (2,5 mL) y agua destilada (5,0 mL). La solución resultante se dejó enfriar hasta 55°C y a esa temperatura se agregaron 0,4 mL de solución de NBT (5,58 mg/mL) y 17,5 µL de *N,N,N',N'*-Tetrametiletilendiamina. Cuando esta mezcla se alcanzó los 50°C, se agregaron 22 µL de solución de enzima (36,4 U/mL) y se mezcló por inversión suave. Posteriormente dicha solución se distribuyó uniformemente sobre la placa cromatográfica seca de manera de cubrir toda la superficie de la misma. Una vez formado el gel, la placa cromatográfica se incubó en una caja de Petri conteniendo con 30 mL de solución de xantina durante 20 minutos a 28°C

#### ***5.18.7 Ensayo de inhibición del sistema PhoP/PhoQ en Salmonella***

Este ensayo fue experimentalmente llevado a cabo por el Dr. Gastón Viarengo y la Dra. Eleonora García Vescovi, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR).

**Solución reveladora:** Se preparó un gel de agar (medio LB 0,6% agar) con agregado de 5-bromo-4-cloro-indoil-β-D-galactopiranosido conteniendo  $60 \times 10^6$  UFC/ mL de la cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esta cepa expresa una fusión transcripcional a *lacZ* del gen representativo activado por PhoP, *pcgG* (14028 *pcgG::lacZ*).

**Procedimiento general:** La solución reveladora, se distribuyó homogéneamente sobre toda la superficie del cromatograma (8,0 cm x 10 cm) generando una capa de espesor uniforme. Una vez gelificada, las placas se incubaron en placas de Petri estériles a 37°C por 18 hs.

La inhibición de la expresión del gen reportero de *phoP* se detectó como halos incoloros en un fondo celeste con una turbidez propia del crecimiento bacteriano. La inhibición del crecimiento bacteriano se detectó como un halo incoloro sobre un fondo celeste pero sin turbidez.

## **5.19 Determinación de $CI_{50}$ de compuestos aislados**

### **5.19.1 Determinación de $CI_{50}$ de compuestos inhibidores de tirosinasa**

Los ensayos de inhibición de la enzima tirosinasa se realizaron en formato de microplaca de 96 pocillos de acuerdo con el método descrito por Atta-ur-Rahman.<sup>139</sup> Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 3,7 % V/V. Se preincubaron 30 unidades de enzima tirosinasa (45  $\mu$ L) con los compuestos a ensayar (10  $\mu$ L) en 125  $\mu$ L de buffer de fosfato (100 mM, pH 6,8) durante 10 min a 25 °C. A continuación, 90  $\mu$ L de solución de L-tirosina (2,7 mM) se añadieron a la mezcla de reacción y la reacción enzimática se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 475 nm (a 37 °C) durante 20 minutos debido a la formación del dopacromo. Los ensayos se repitieron dentro del rango de concentraciones desde 833,33 hasta 0,41  $\mu$ M del potencial compuesto inhibidor a evaluar. También se realizaron ensayos con doce diluciones al medio en serie preparadas por dilución de solución (45 mM) del inhibidor de referencia ácido kójico. Posteriormente, el ajuste de curvas para calcular la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se realizó utilizando GraphPad Prism V 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los estudios fueron llevados a cabo al menos por triplicado y los resultados representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). En experimentos que requieren DMSO para disolver el inhibidor se realizaron ensayos de control empleando la mezcla de ensayo con la misma cantidad de DMSO sin inhibidor.

### **5.19.2 Determinación de $CI_{50}$ de compuestos inhibidores de xantina oxidasa**

Los ensayos de inhibición de la enzima xantina oxidasa se realizaron en formato de microplaca de 96 pocillos bajo condiciones aeróbicas.<sup>150</sup> Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 3,7 % V/V. Se preincubaron con 38  $\mu$ L de solución de enzima xantina oxidasa (concentración final de 0,01 U/ml) y 214  $\mu$ L de buffer de fosfato (200 mM, pH 7,5) con los compuestos a ensayar (10  $\mu$ L) durante 10 min a 25 °C. La reacción fue iniciada por la adición de 18  $\mu$ L del sustrato xantina (concentración final de 0,1 mM), la

reacción enzimática se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 295 nm (a 30 °C) indicando la formación de ácido úrico. El volumen final del ensayo fue 270  $\mu$ L. Los ensayos se repitieron dentro del rango de concentraciones del potencial compuesto inhibidor desde 833,33 hasta 0,41  $\mu$ M, doce diluciones al medio en serie preparadas por dilución de solución de inhibidor (45 mM). También se realizaron ensayos con doce diluciones al medio en serie preparadas por dilución de solución (45 mM) del inhibidor de referencia alopurinol. Posteriormente, el ajuste de curvas para calcular la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se realizó utilizando GraphPad Prism V 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los estudios fueron llevados a cabo al menos por triplicado y los resultados representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). En los experimentos que requirieron DMSO para disolver el inhibidor se realizaron ensayos de control empleando la mezcla de ensayo con la misma cantidad de DMSO sin inhibidor.

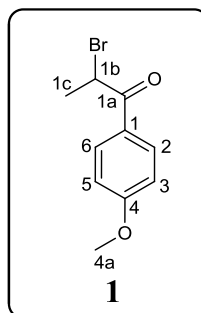
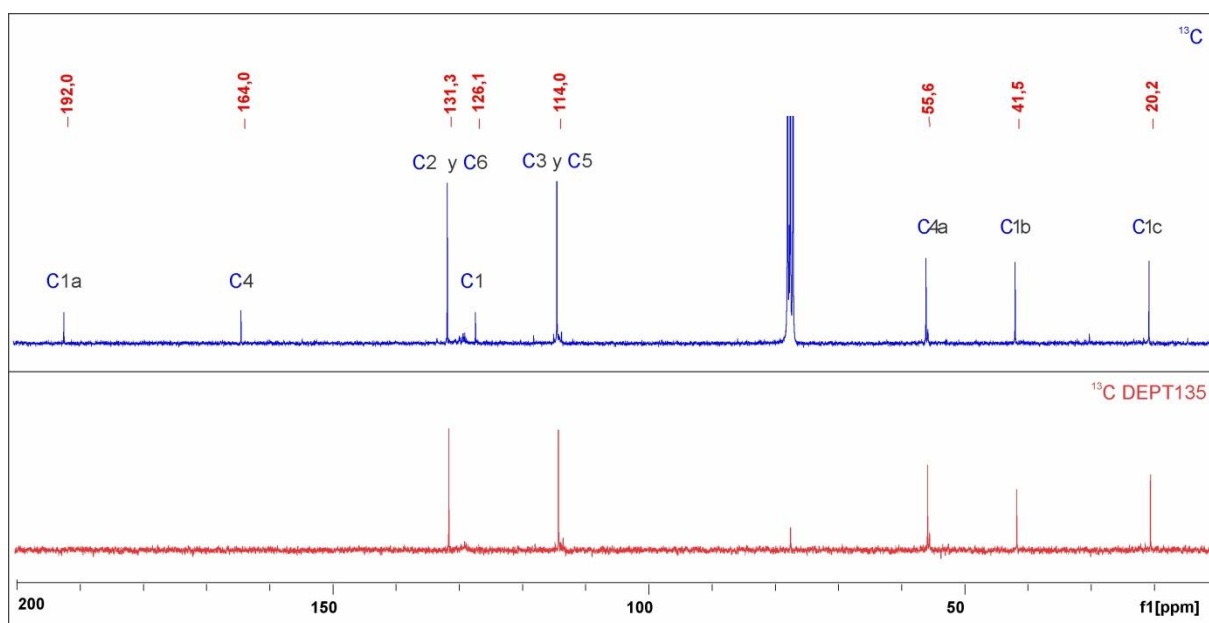
### ***5.19.3 Determinación de $CI_{50}$ de compuestos inhibidores de acetilcolinesterasa***

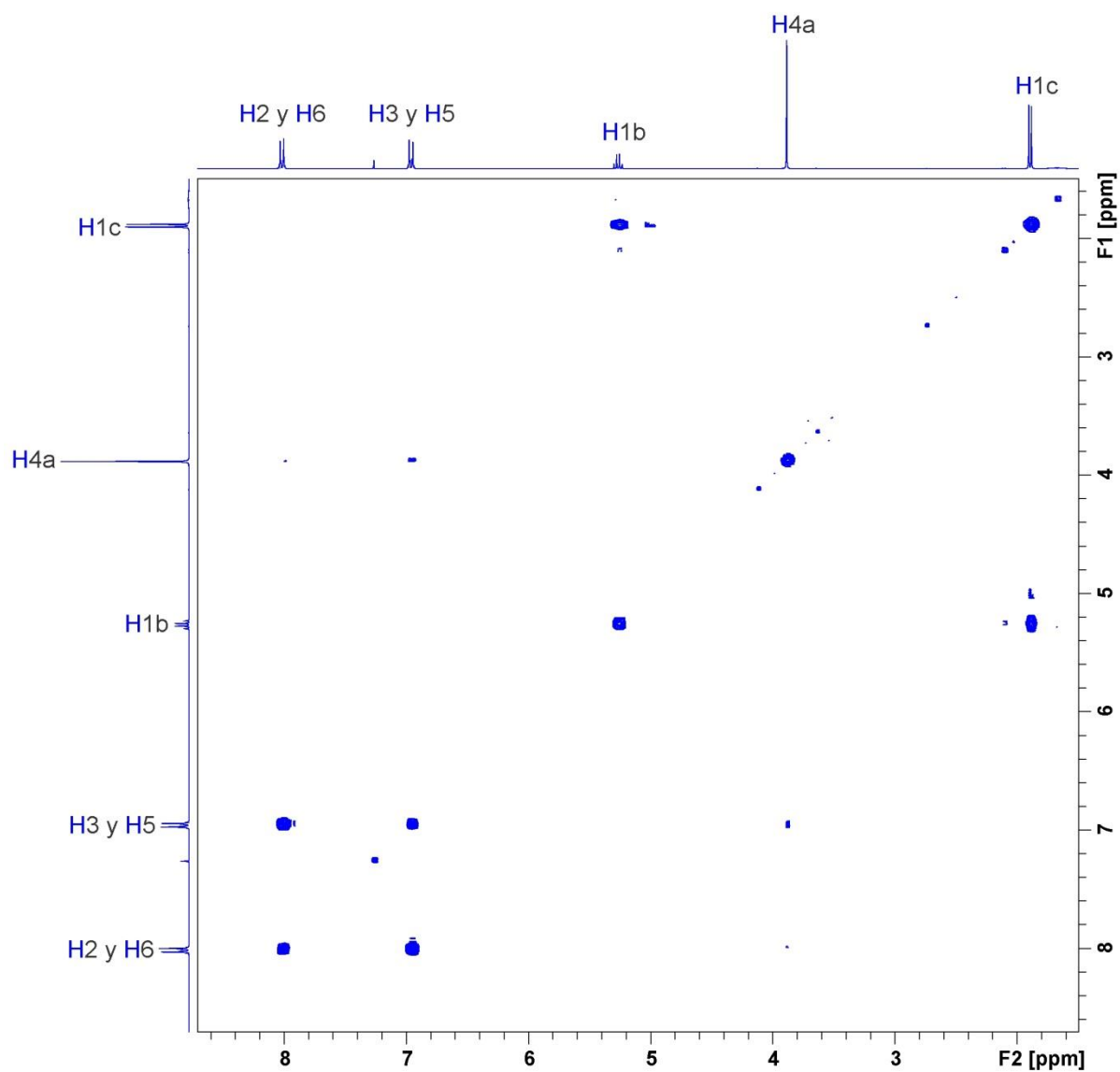
Los ensayos de inhibición de la acetilcolinesterasa se realizaron en formato de microplaca de 96 pocillos de acuerdo con el método descrito por Ellman.<sup>108, 151</sup> Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración de 3,7 % V/V. Se preincubaron 25  $\mu$ L de solución de enzima acetilcolinesterasa (concentración final de 0,037 U/ml) y 214  $\mu$ L de reactivo de Ellman (concentración final de 5,5-ditiobis-(2- ácido nitrobenzoico) de 0,15 mM) en buffer de fosfato (100 mM, pH 7,4) con los compuestos a ensayar (10  $\mu$ L) durante 10 min a 25 °C. La reacción fue iniciada por adición de 10  $\mu$ L del sustrato yoduro de acetiltiocolina (concentración final de 0,23 mM), la reacción enzimática se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 412 nm (a 25 °C) durante 180 segundos. El volumen final del ensayo fue 270  $\mu$ L. Estos ensayos se repitieron dentro del rango de concentraciones desde 833,33 hasta 0,41  $\mu$ M del potencial compuesto inhibidor a evaluar. También se realizaron ensayos con doce diluciones al medio en serie preparadas por dilución de solución (45 mM) del inhibidor de referencia fisostigmina. Posteriormente, el ajuste de curvas para calcular la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) se realizó utilizando GraphPad Prism V 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Todos los estudios fueron llevados a cabo al menos por triplicado y los resultados representan la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). En los experimentos que requirieron DMSO para disolver el inhibidor se realizaron ensayos de control empleando la mezcla de ensayo con la misma cantidad de DMSO sin inhibidor.

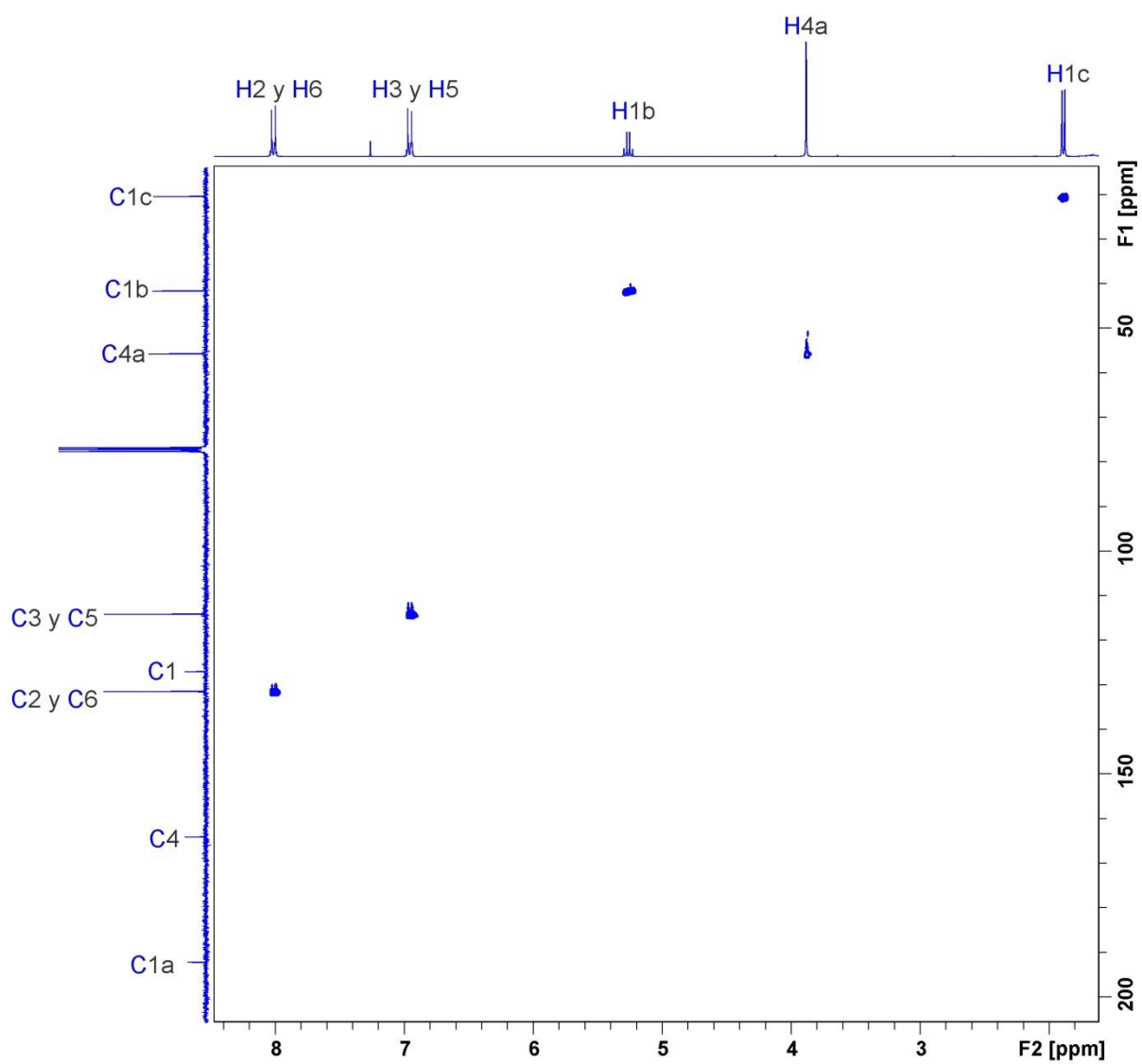


## **6. ANEXOS**

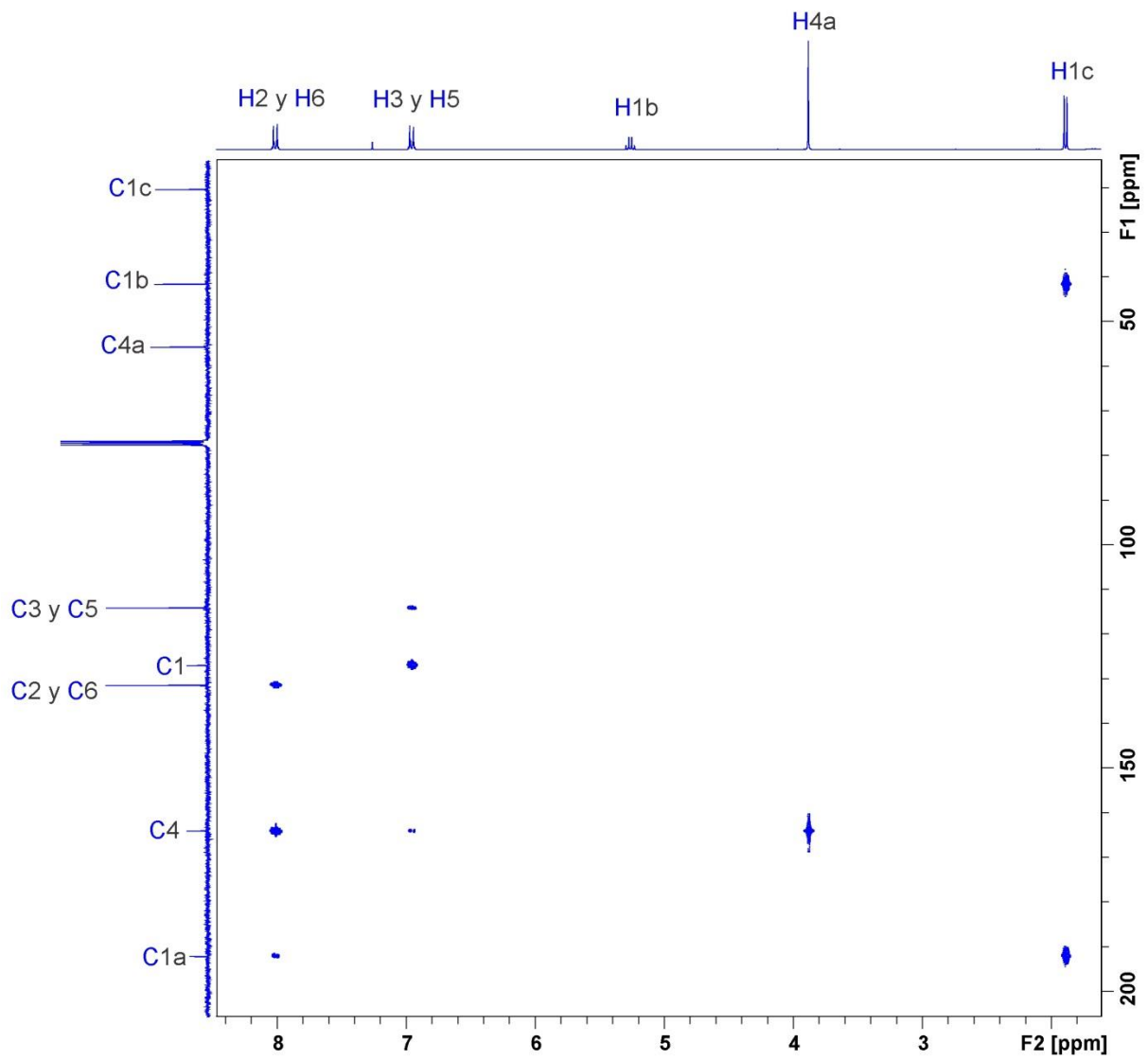


**I. Anexo: Experimentos de RMN para el Compuesto 1****A. Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT135**

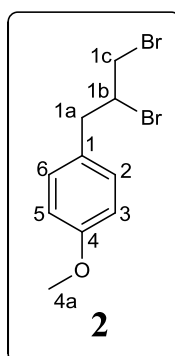
**B. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY**

C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

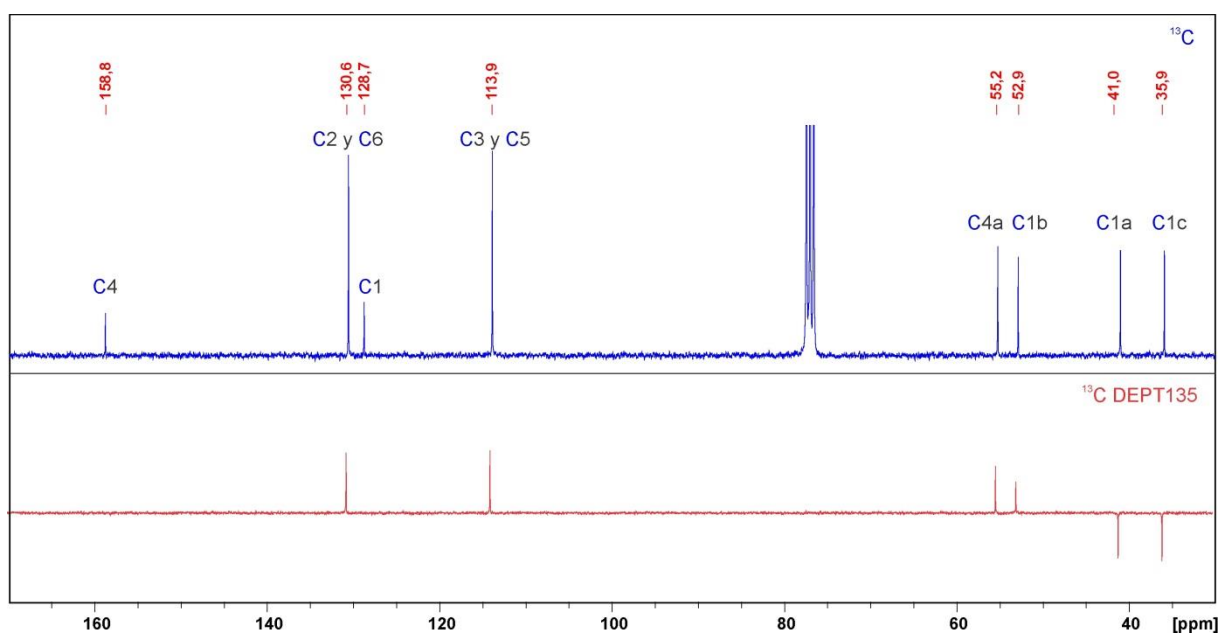
D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC



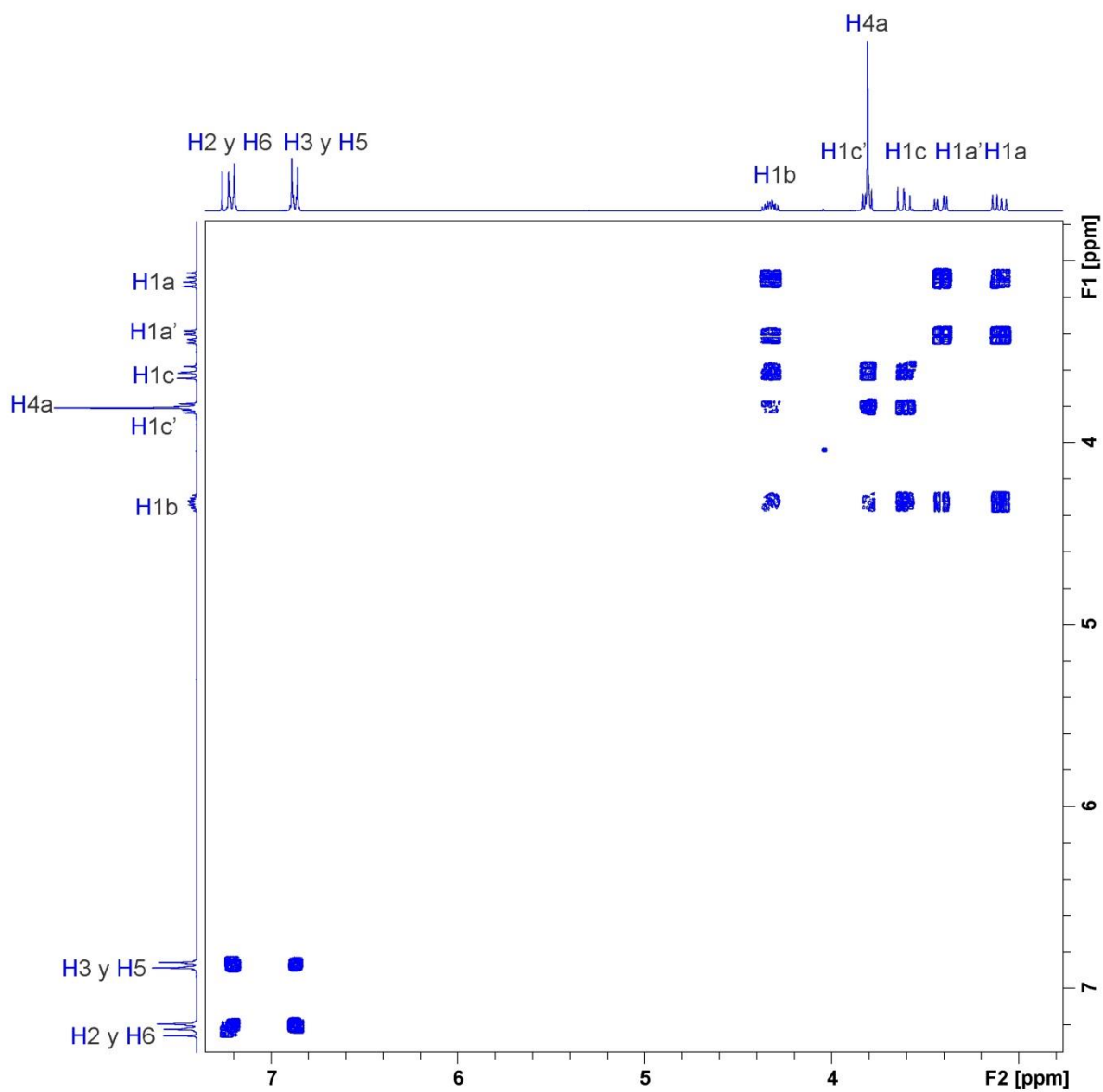
## II. Anexo: Experimentos de RMN para el Compuesto 2

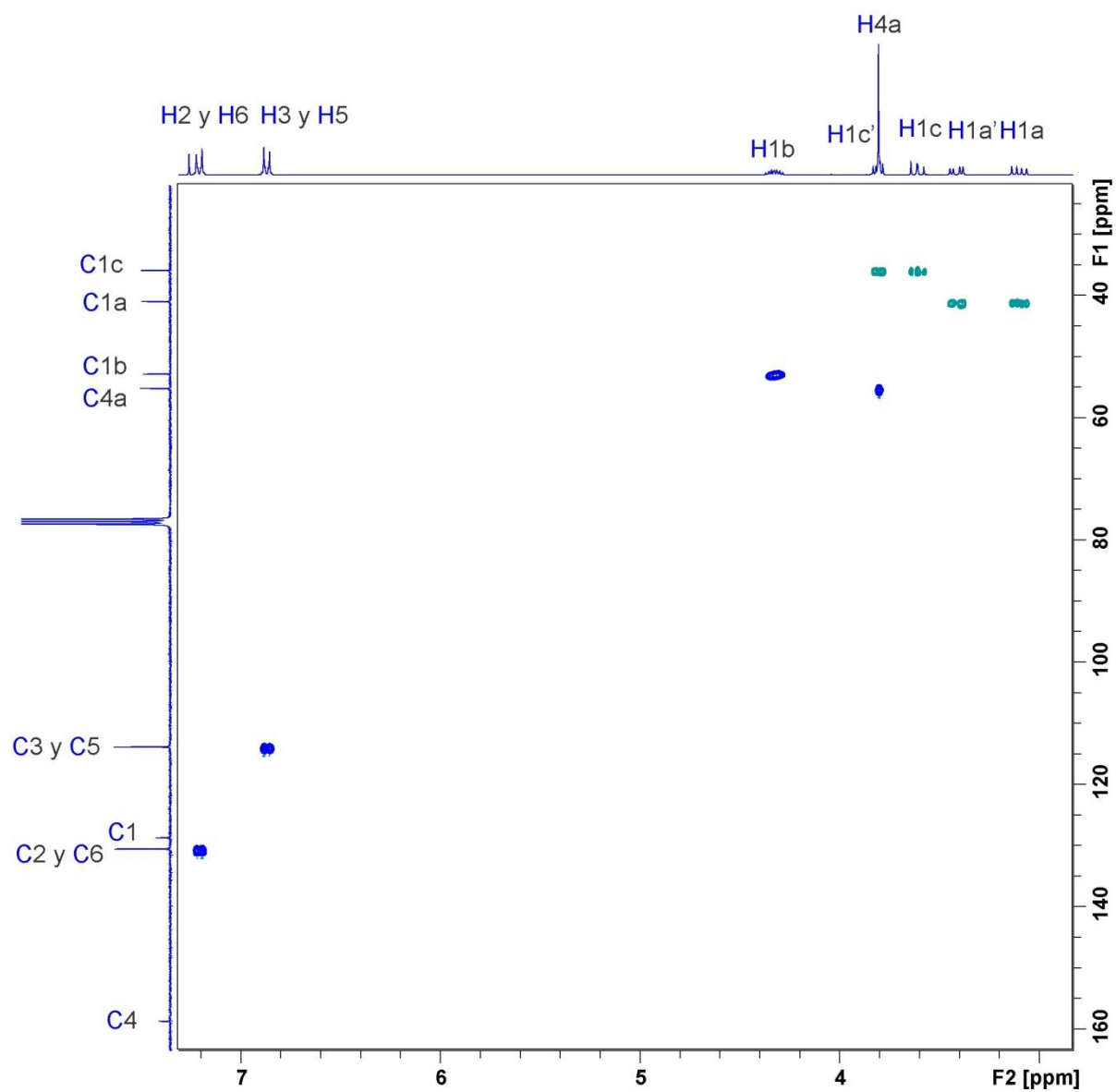


### A. Espectros de $^{13}\text{C}$ y $^{13}\text{C}$ DEPT135

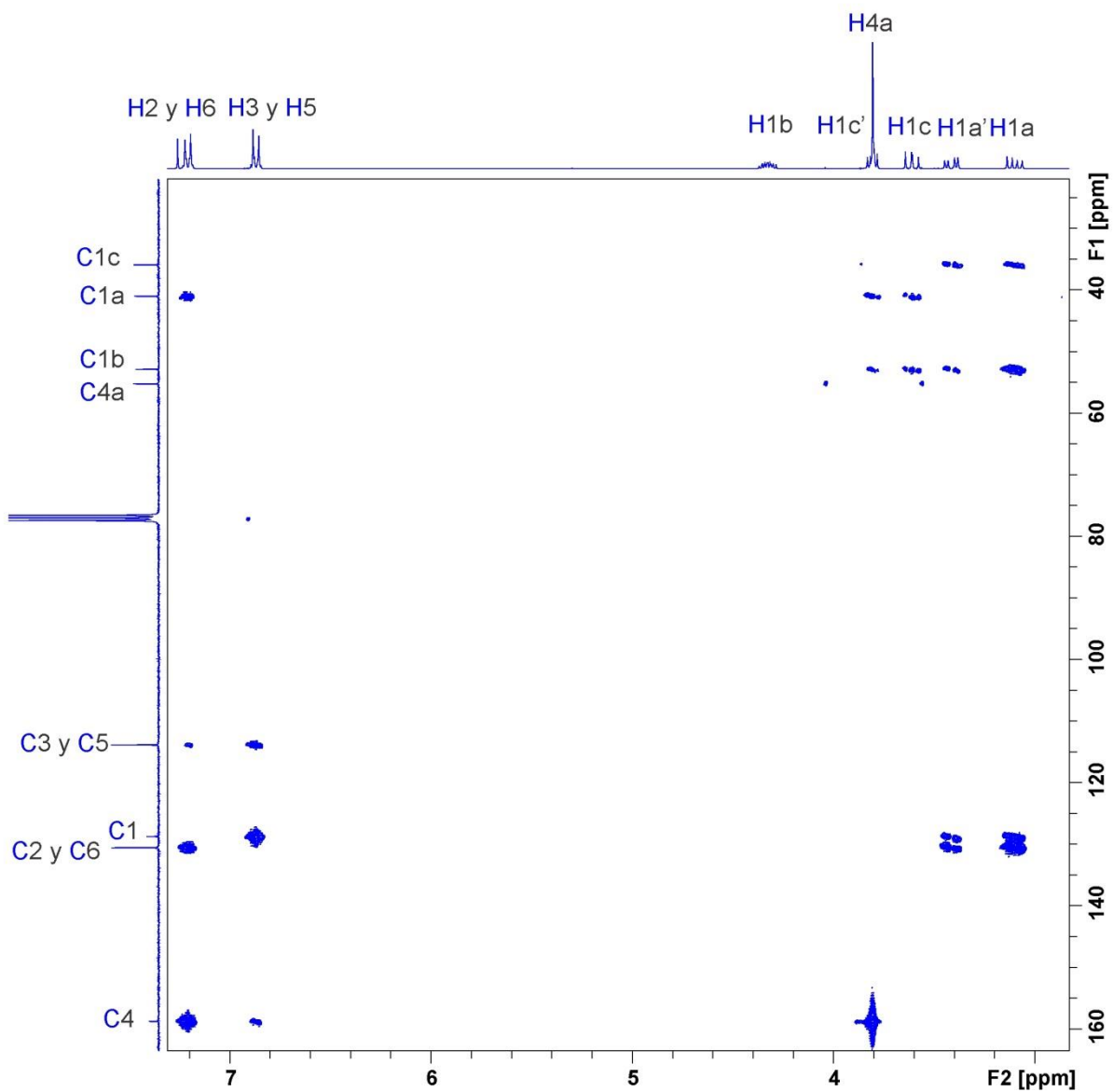


**B. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY**

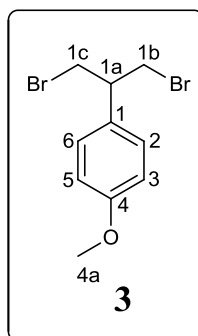


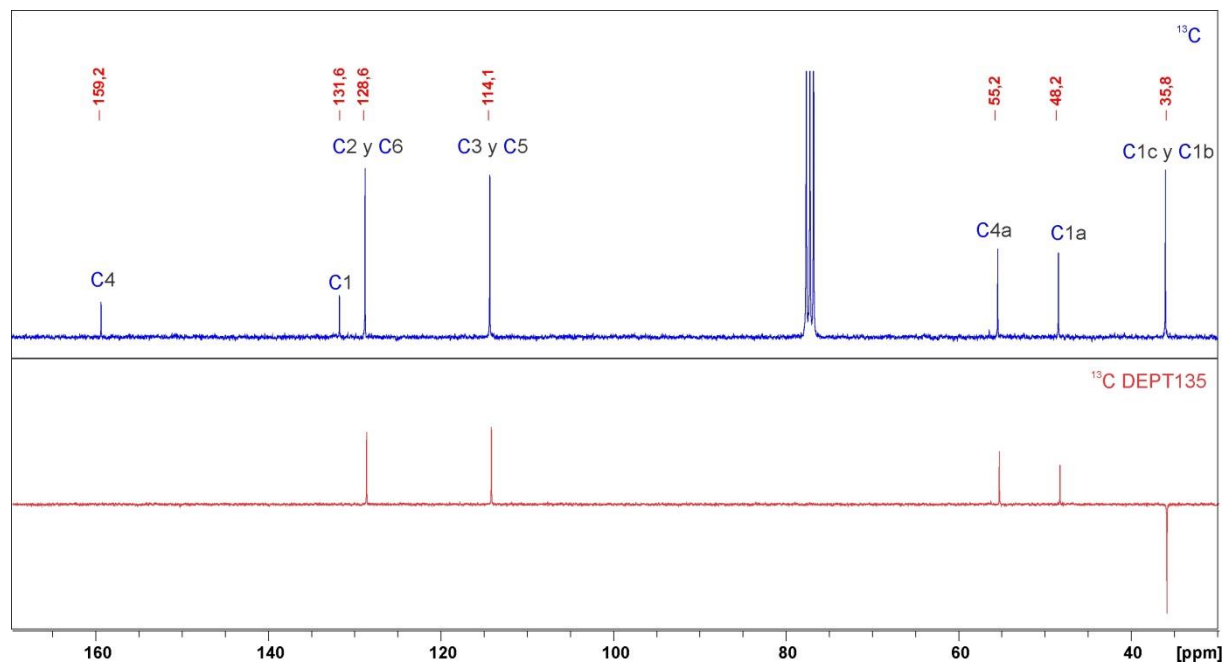
C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

**D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC**

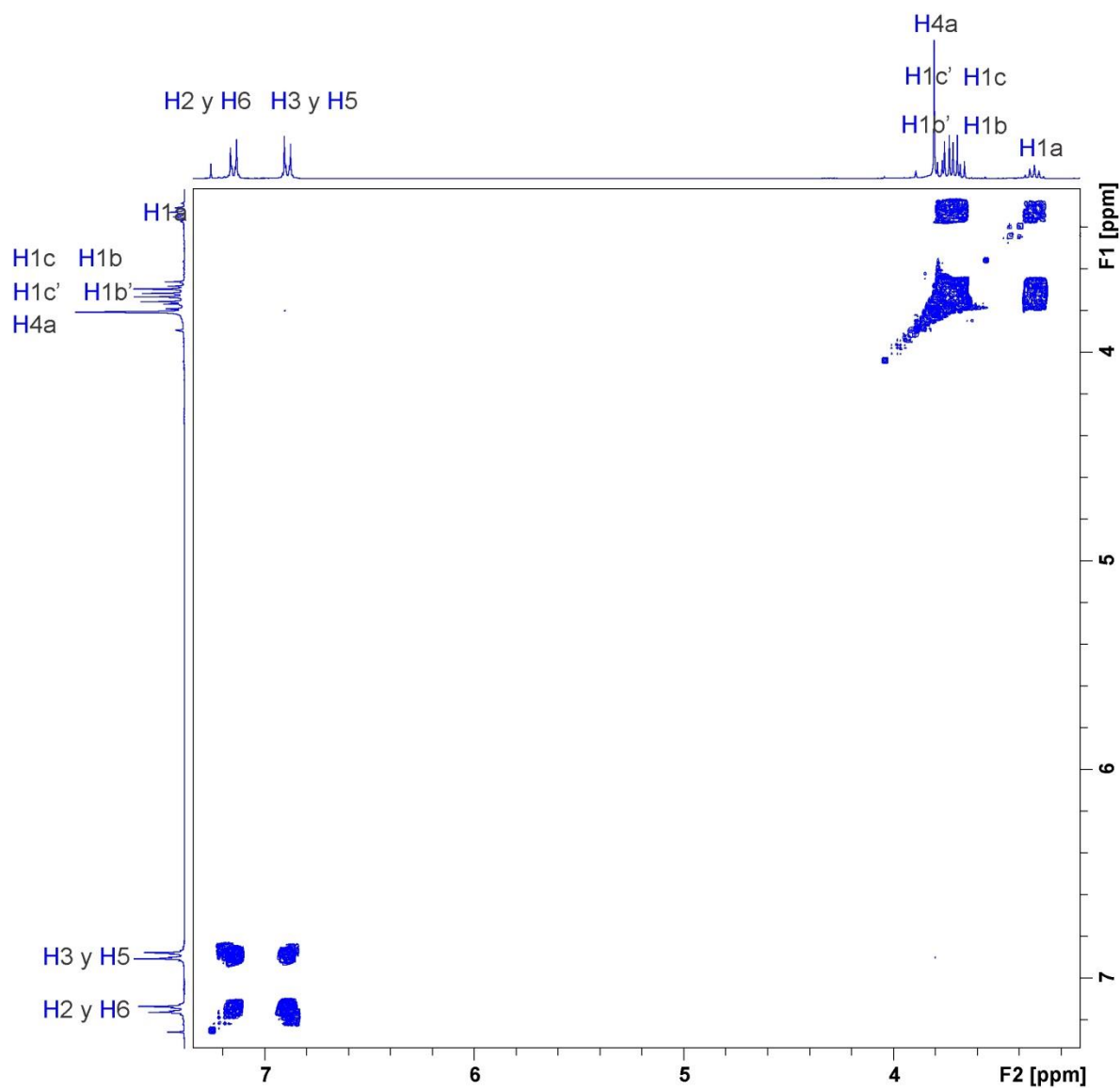


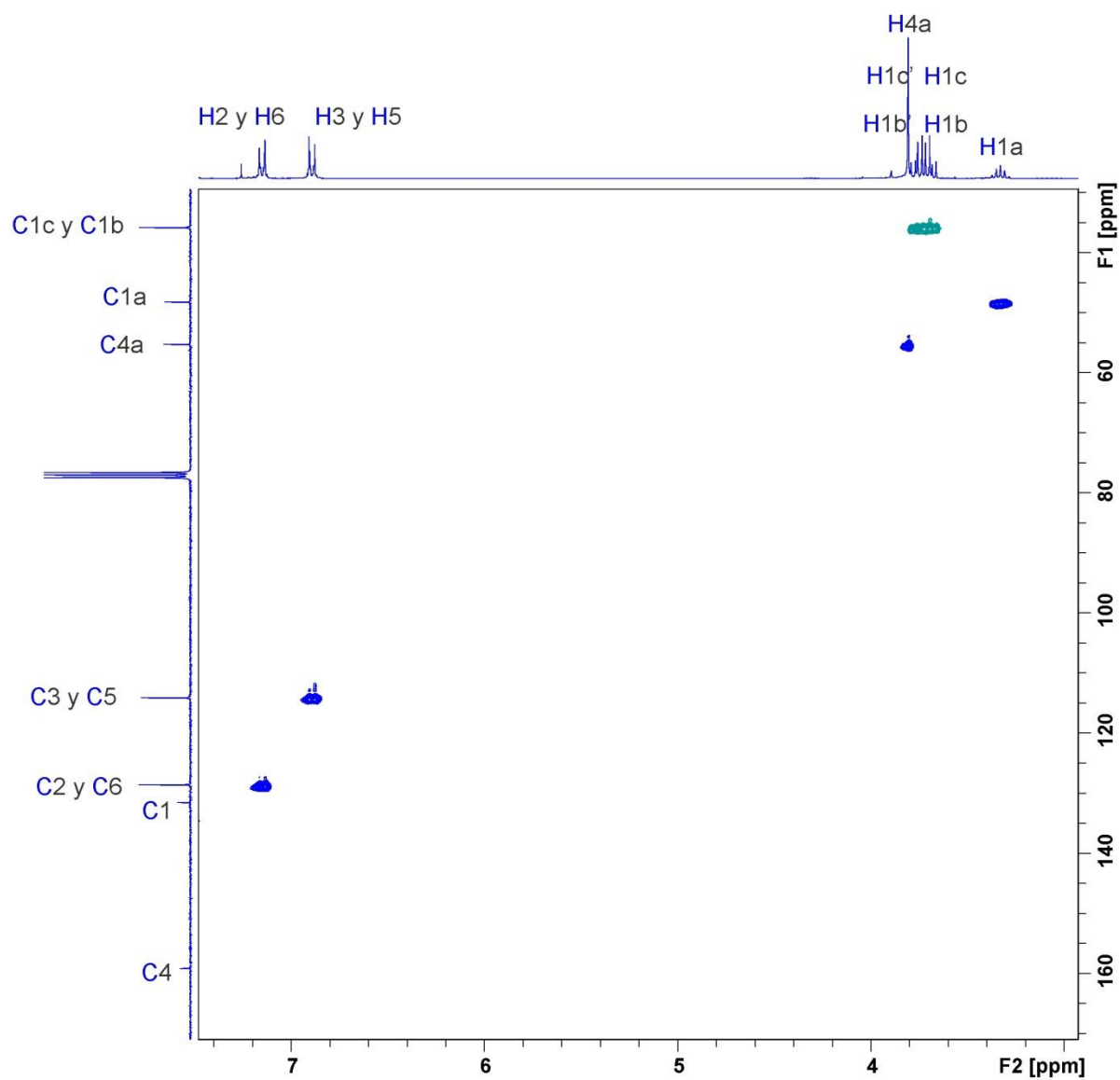
**III. Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto 3**



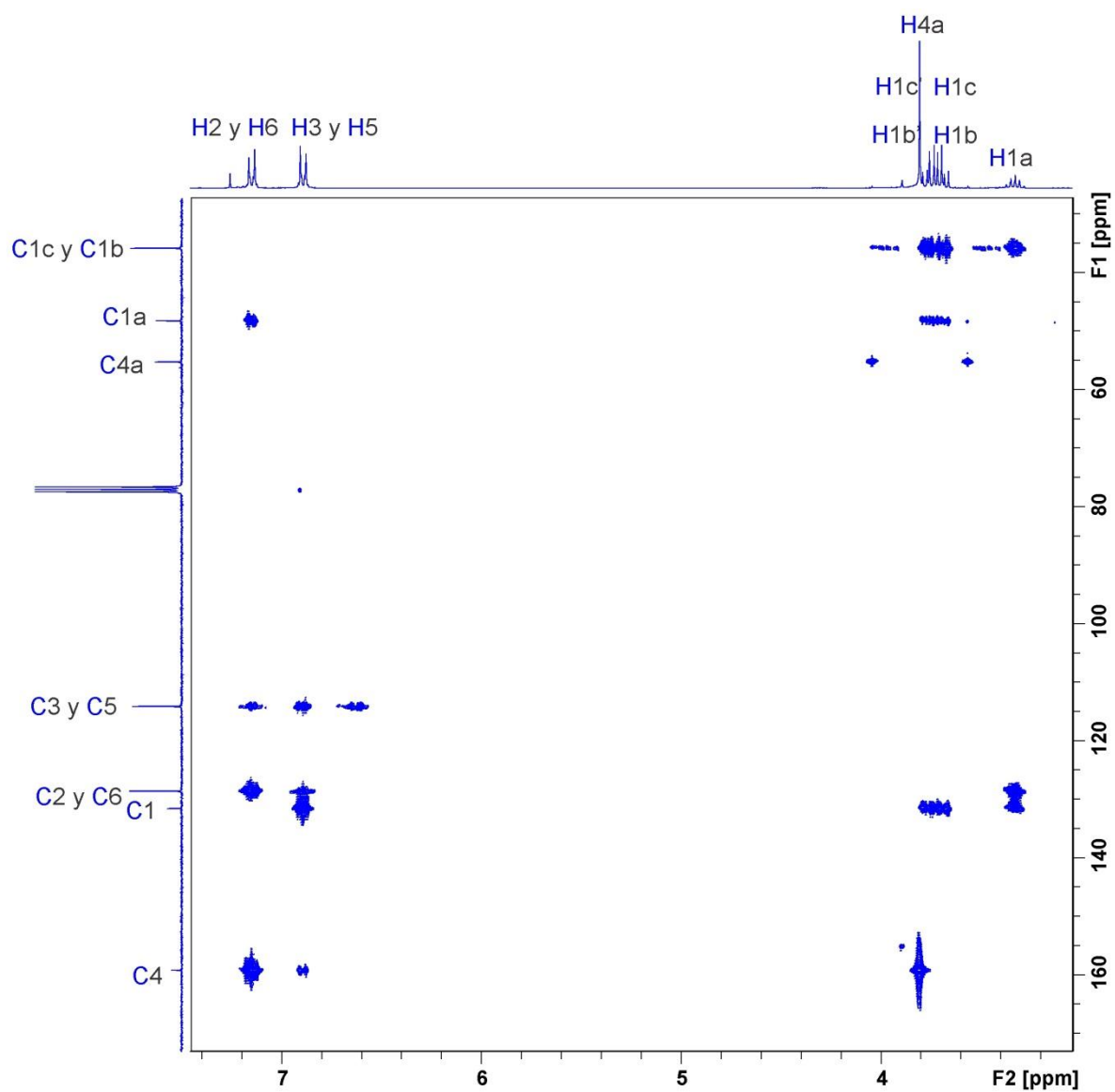
A. Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT135

**B. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY**

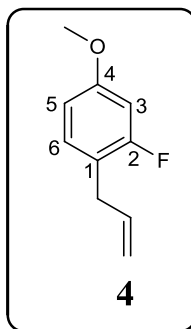


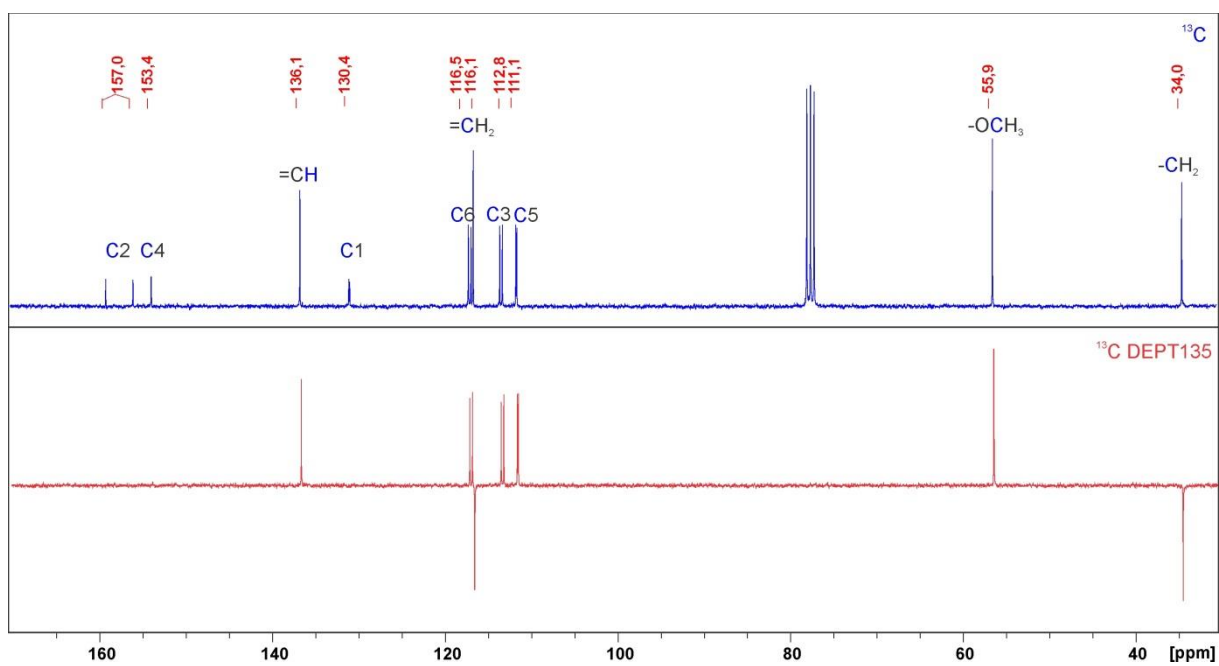
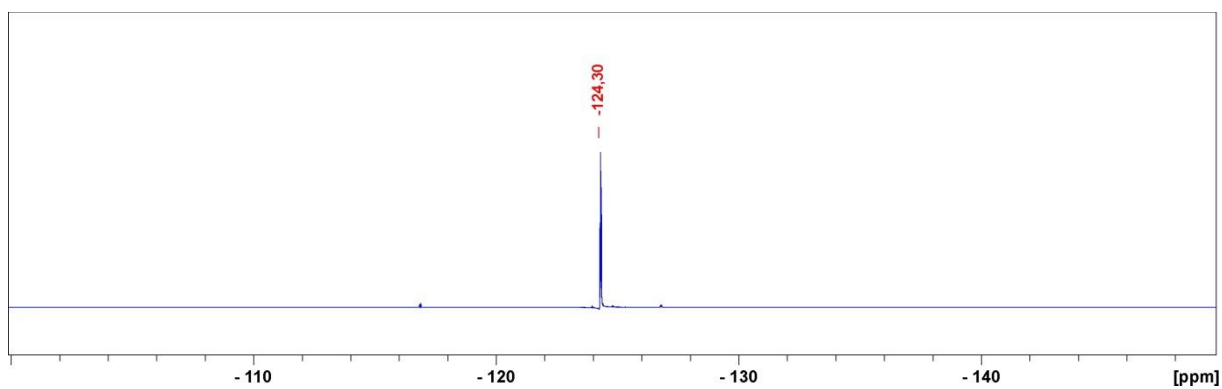
C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

**D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC**

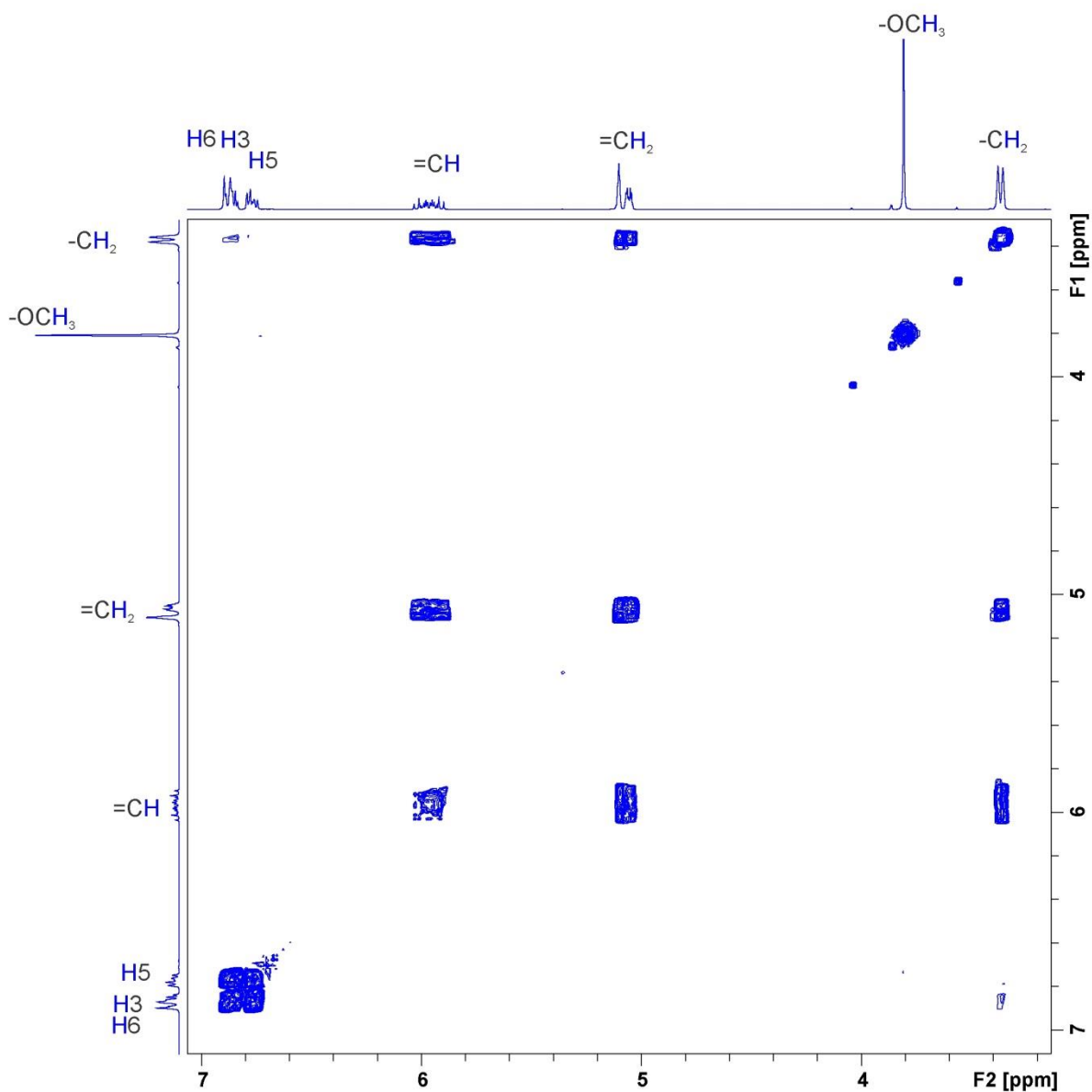


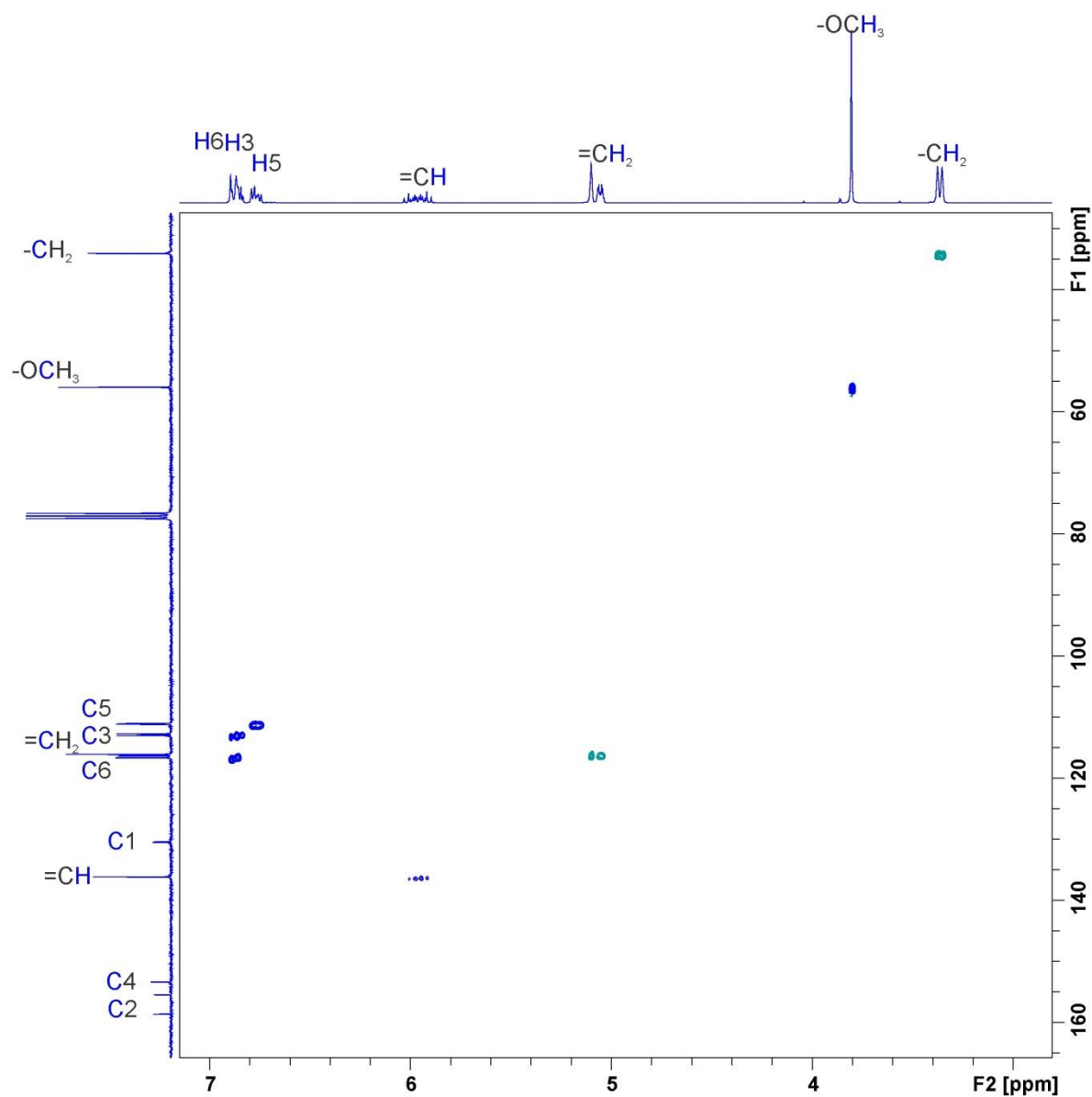
**IV. Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto 4**



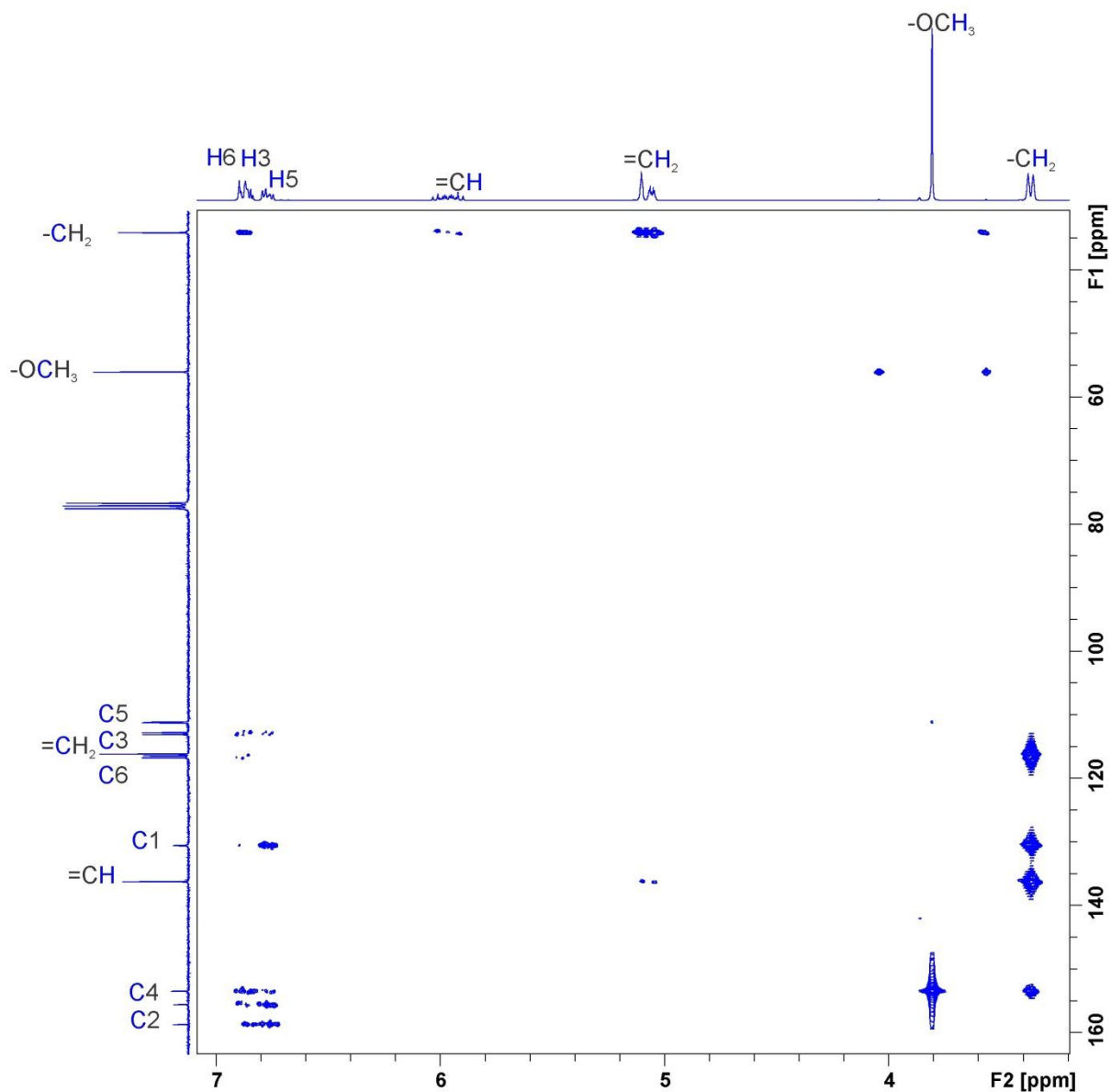
**A. Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT135****B. Espectro de  $^{19}\text{F}$** 

C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

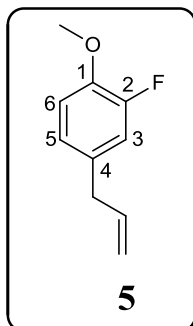


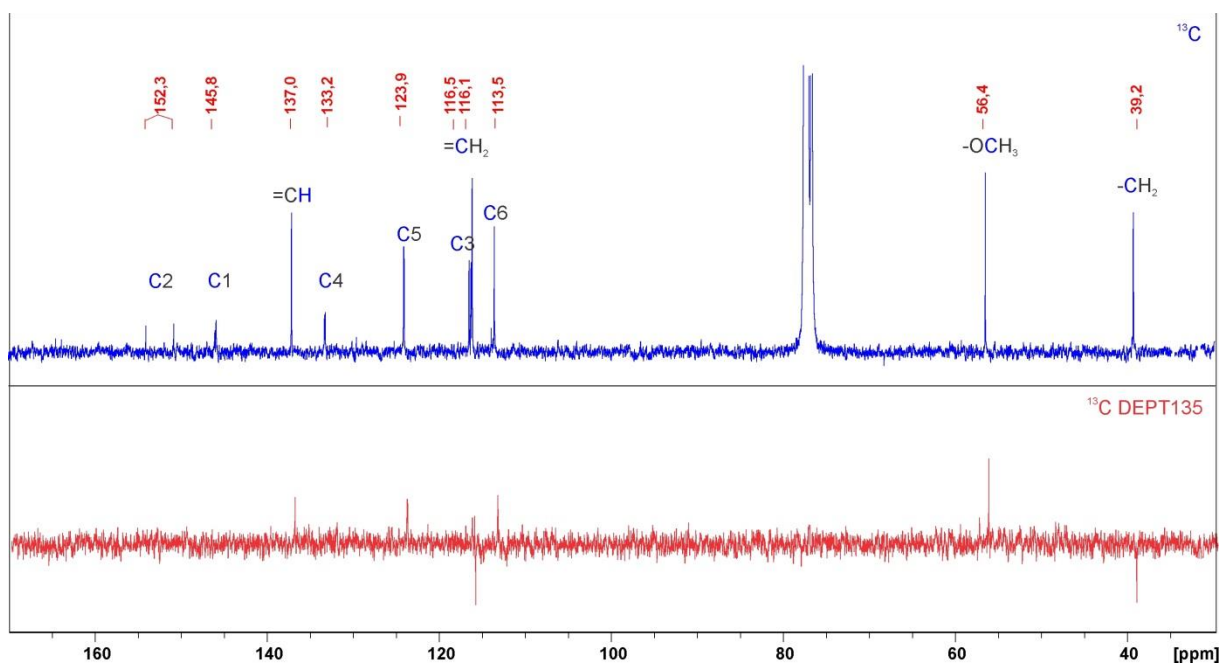
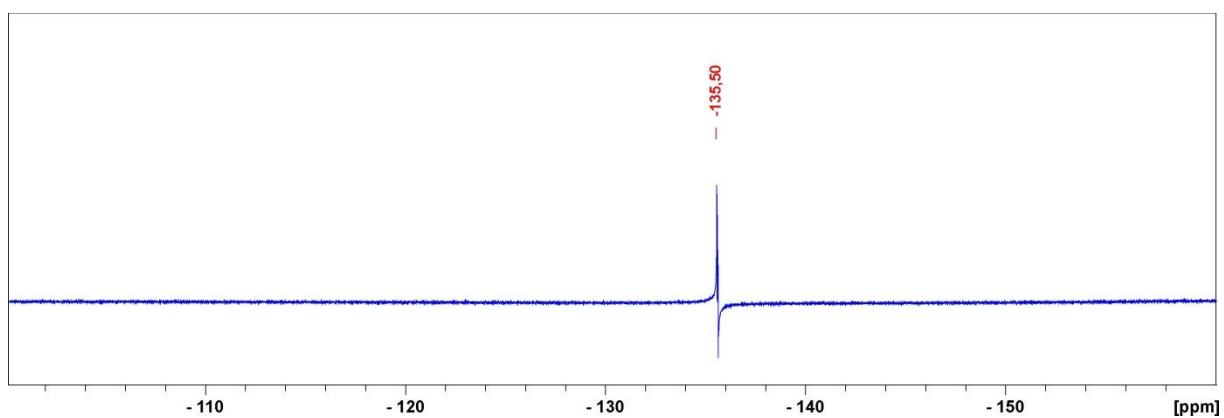
D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

**E. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC**

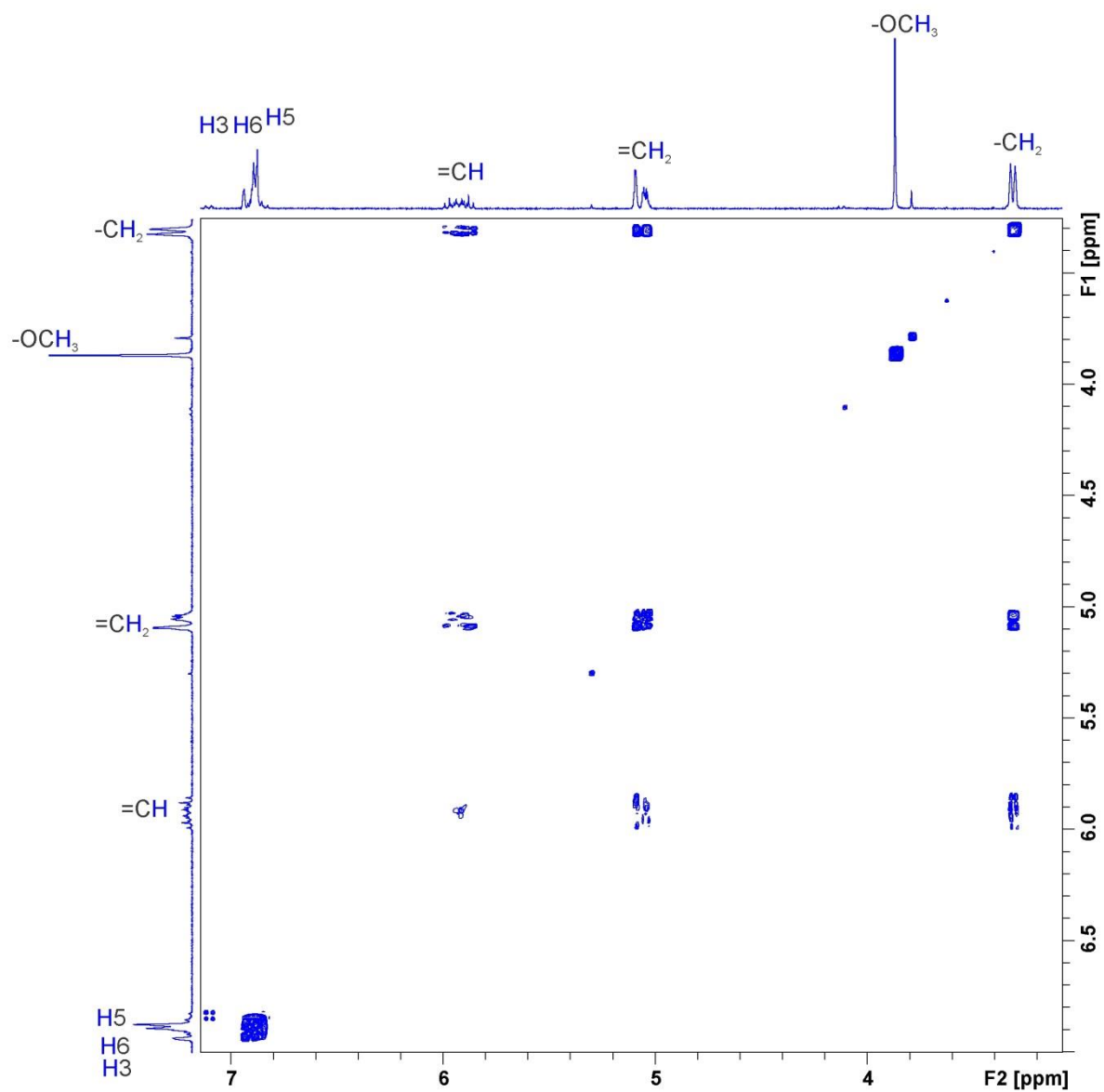


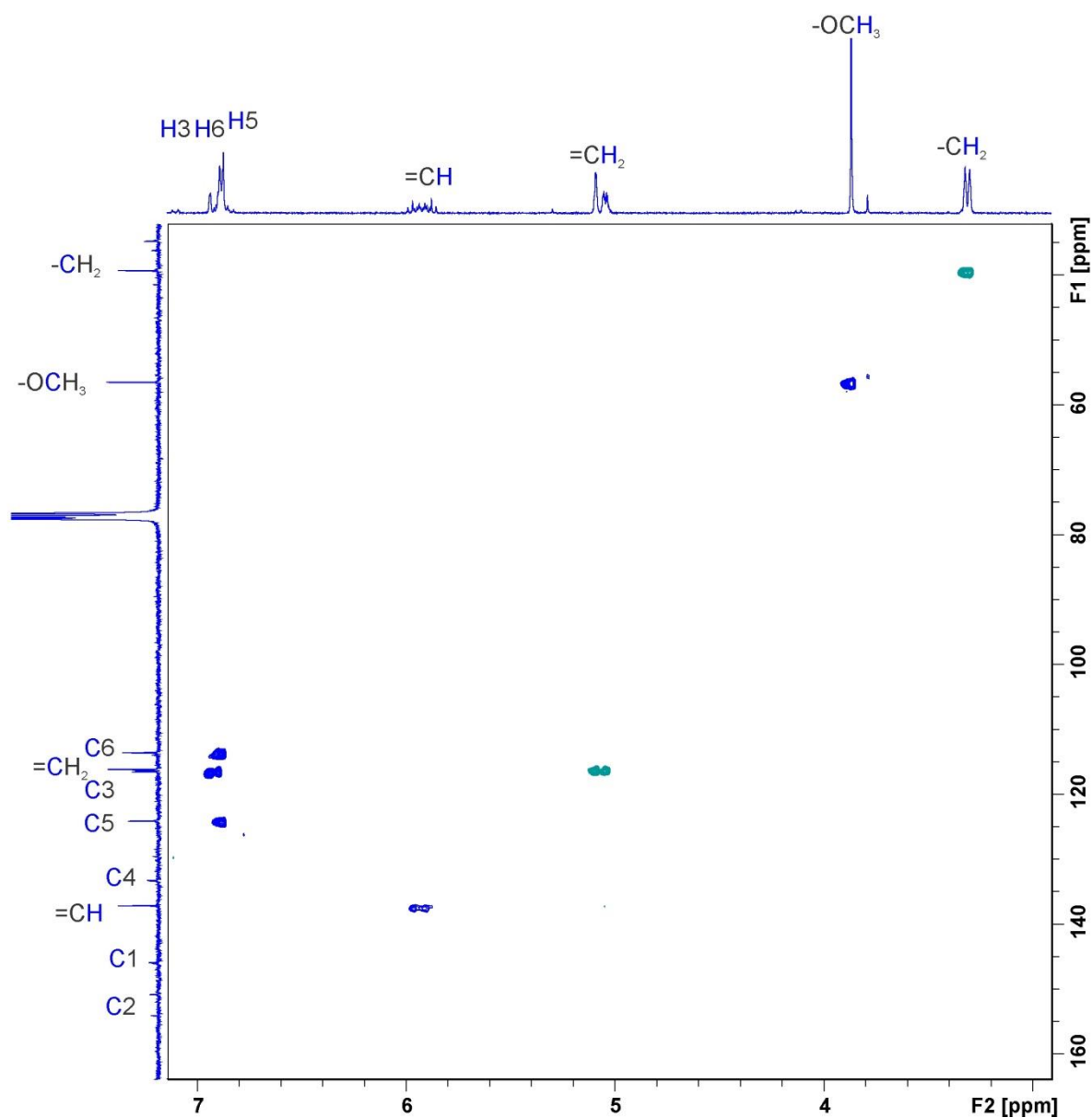
**V. Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto 5**

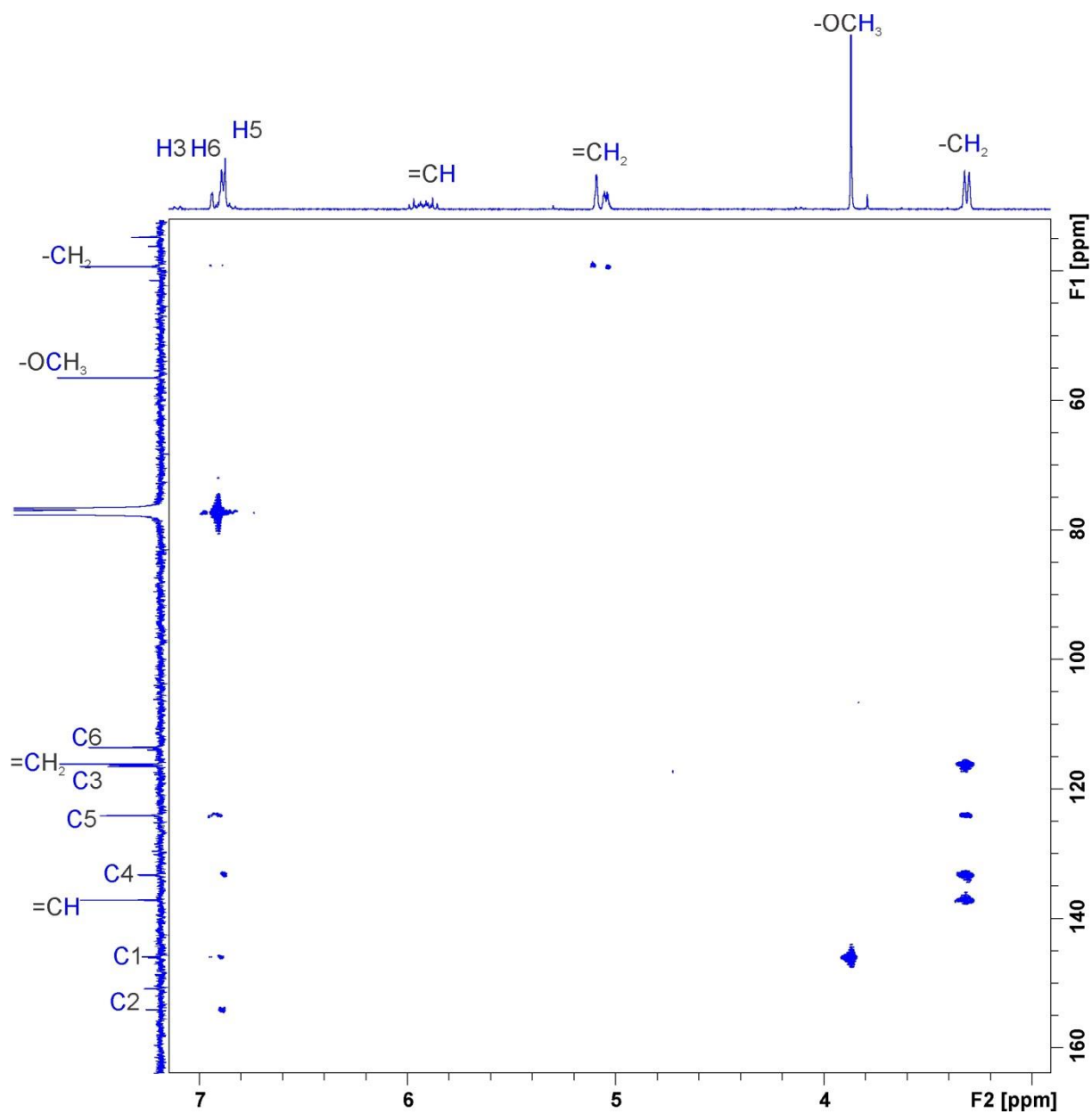


**A. Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT135****B. Espectro de  $^{19}\text{F}$** 

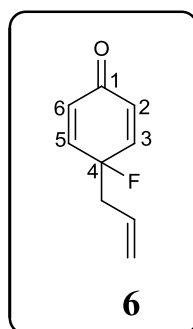
C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

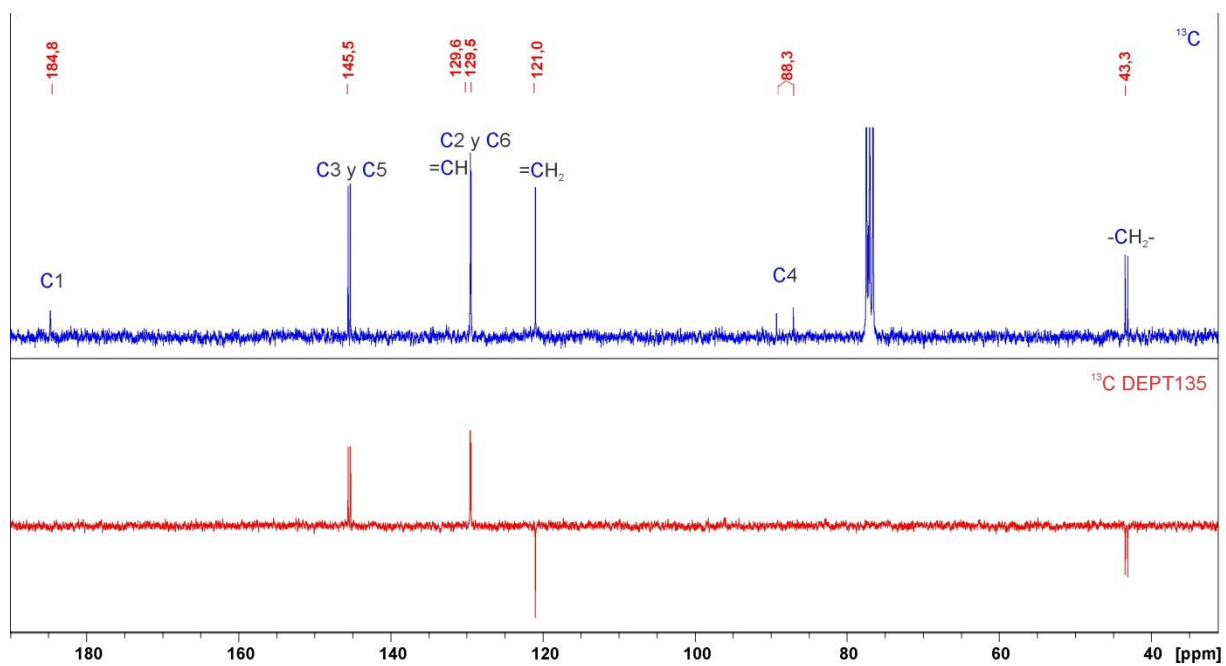
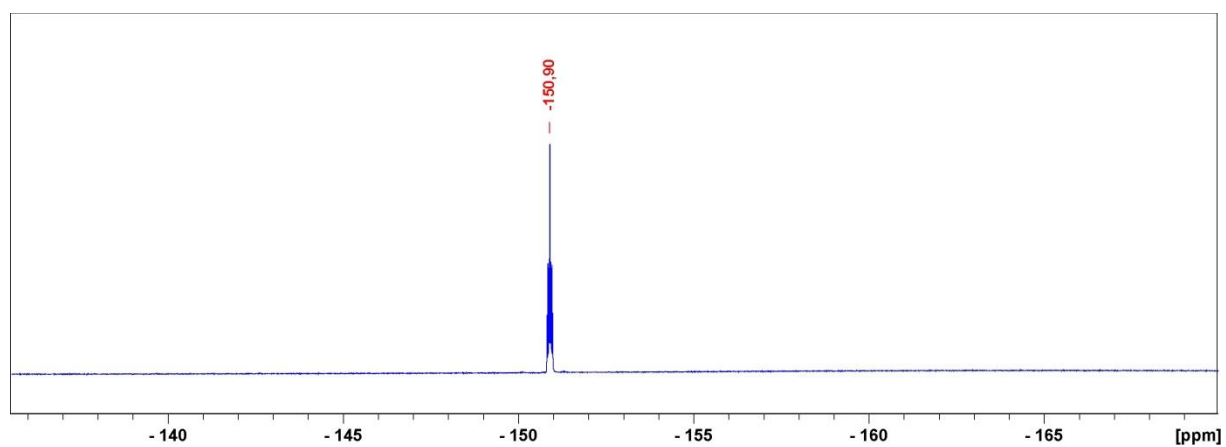


D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC

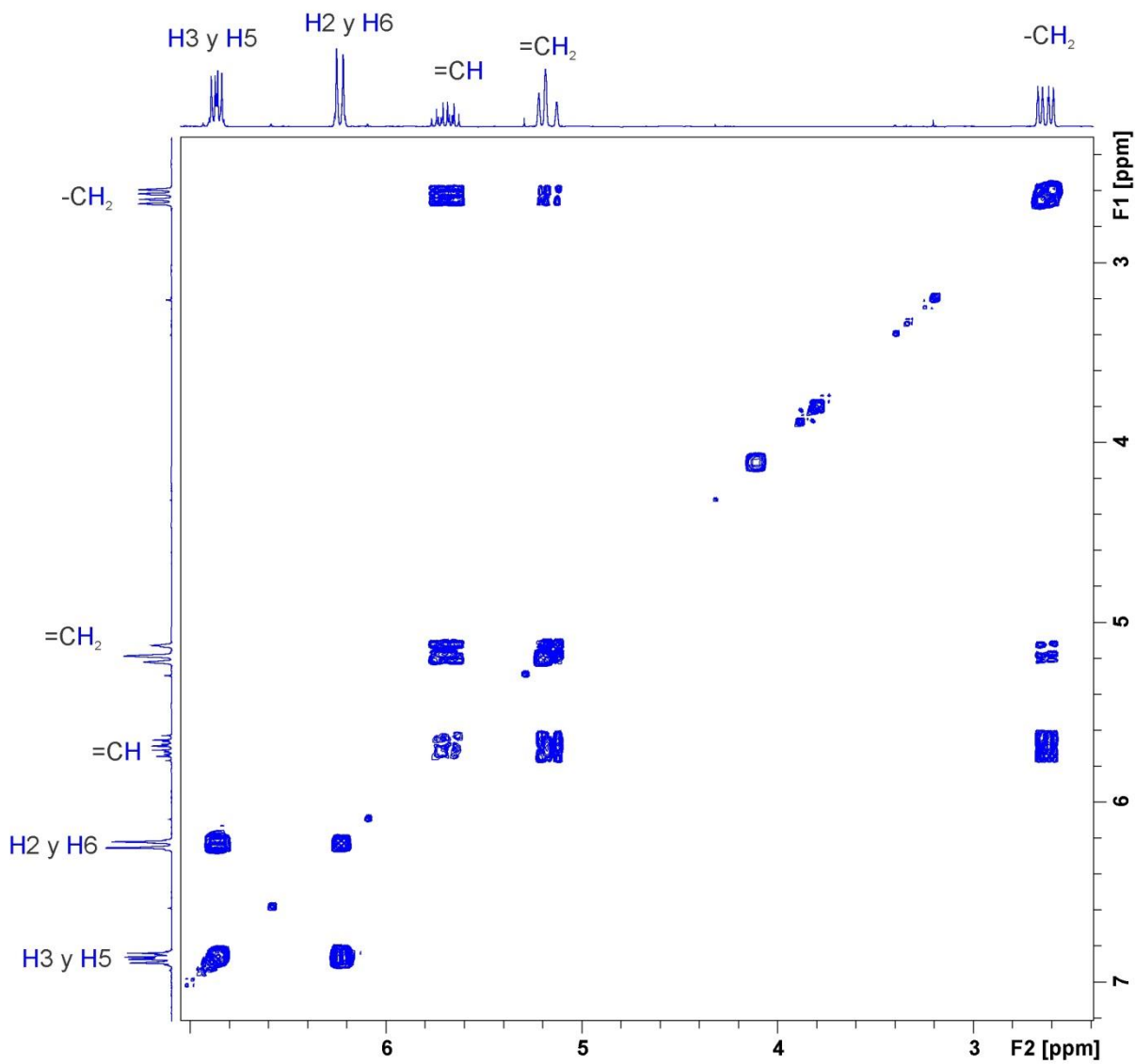
E. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

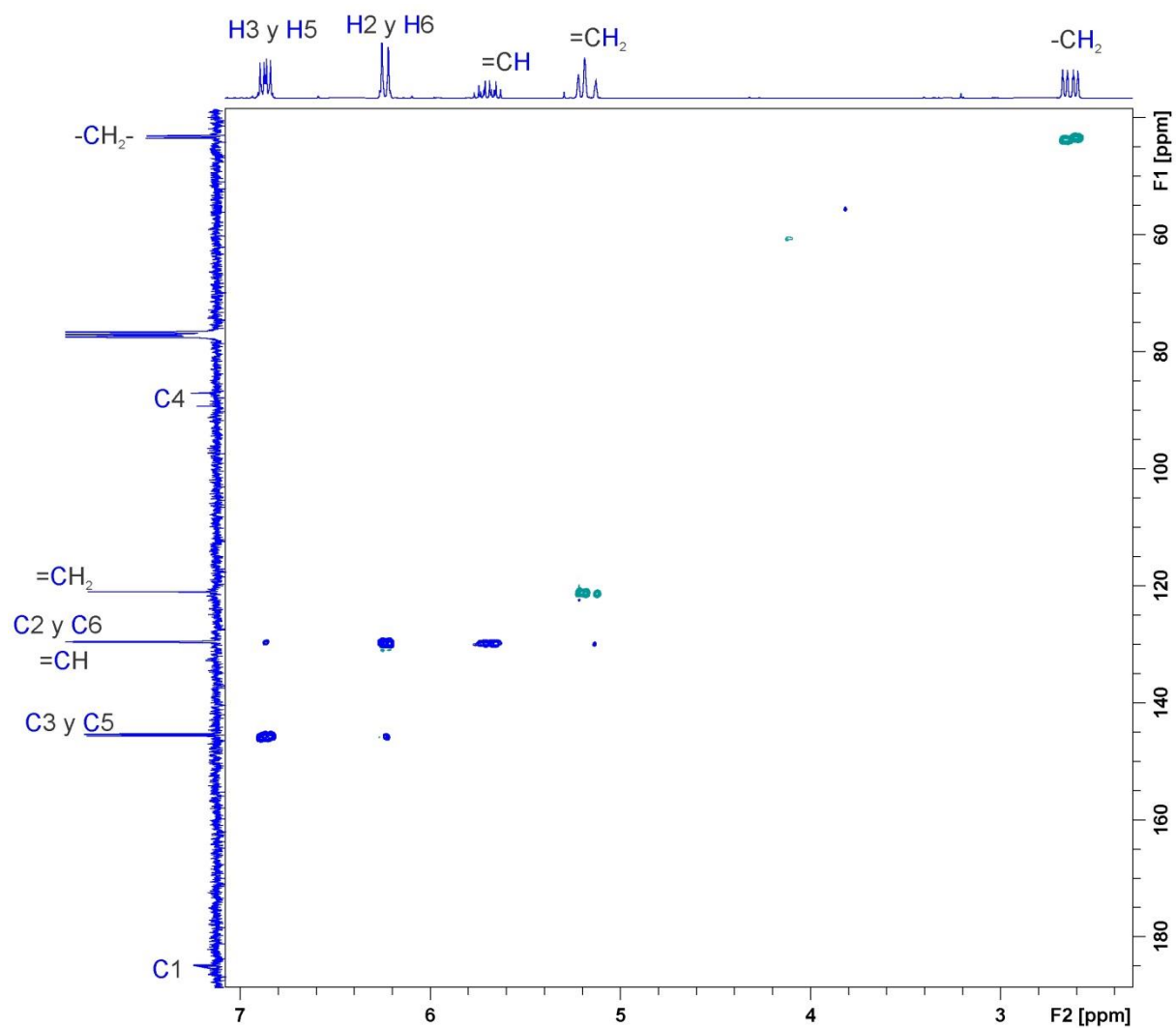
## VI. Anexo: Experimentos de RMN para el compuesto 6



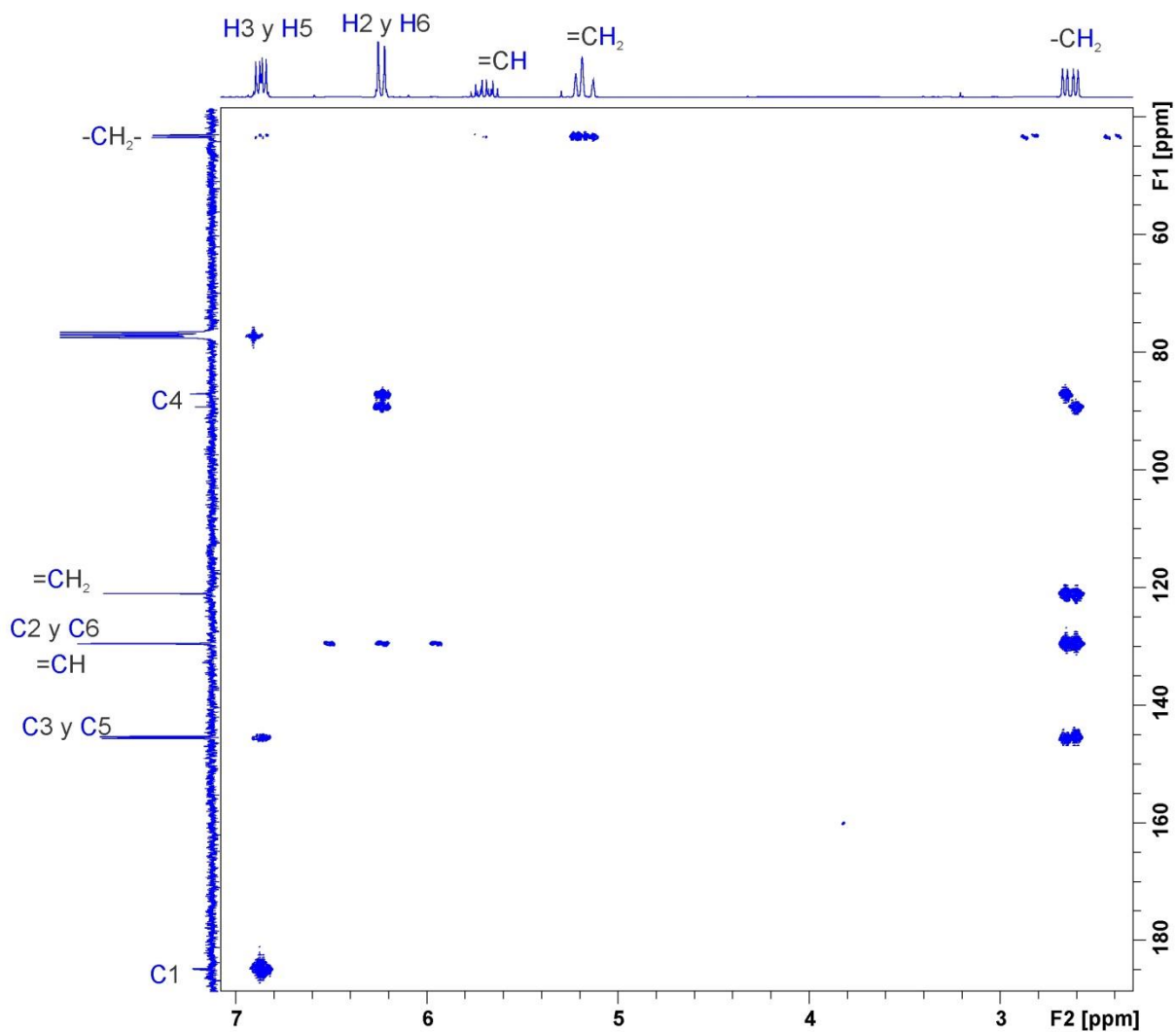
**A. Espectros de  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT135****B. Espectro de  $^{19}\text{F}$** 

C. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY



**D. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC**

**E. Espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC**



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Clardy, J. y Walsh, C. **2004**. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837.
2. Ertl, P., Roggo, S. y Schuffenhauer, A. **2008**. Natural product-likeness score and its application for prioritization of compound libraries. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48, 68-74.
3. Newman, D. J., Cragg, G. M. y Snader, K. M. **2003**. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66, 1022-1037.
4. Newman, D. J. y Cragg, G. M. **2007**. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70, 461-477.
5. Newman, D. J. y Cragg, G. M. **2012**. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75, 311-335.
6. Cragg, G. M., Grothaus, P. G. y Newman, D. J. **2009**. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents†. *Chem. Rev.*, 109, 3012-3043.
7. Harvey, A. L. **2007**. Natural products as a screening resource. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11, 480-484.
8. Harvey, A. L. **2008**. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-941.
9. Carter, G. T. **2011**. Natural products and pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1783-1789.
10. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. y Quinn, R. J. **2015**. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, 14, 111-129.
11. Maltese, F., van der Kooy, F. y Verpoorte, R. **2009**. Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Nat Prod Commun*, 4, 447-454.
12. Horinouchi, S. **2009**. Combinatorial biosynthesis of plant medicinal polyketides by microorganisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13, 197-204.
13. Zhang, C., Weller, R. L., Thorson, J. S. y Rajsiki, S. R. **2006**. Natural product diversification using a non-natural cofactor analogue of s-adenosyl-l-methionine. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 2760-2761.
14. Lopez, S. N., Ramallo, I. A., Sierra, M. G., Zacchino, S. A. y Furlan, R. L. **2007**. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104, 441-444.
15. Ramallo, I. A., Salazar, M. O., Mendez, L. y Furlan, R. L. E. **2011**. Chemically engineered extracts: Source of bioactive compounds. *Acc. Chem. Res.*, 44, 241-250.
16. Buckingham, J. **2001**. Dictionary of natural products on cd-rom Hall, C., Ed. London.

17. Ramallo, I. A. **2005** Desarrollo de herramientas para la expansión de diversidad molecular (edm) de colecciones naturales. Tesina para optar al grado de Licenciado en Biotecnología, UNR, pp 49-51.
18. Wu, T., Jiang, C., Wang, L., Morris-Natschke, S. L., Miao, H., Gu, L., Xu, J., Lee, K.-H. y Gu, Q. **2015**. 3,5-diarylpyrazole derivatives obtained by ammonolysis of the total flavonoids from chrysanthemum indicum extract show potential for the treatment of alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.*, 78, 1593-1599.
19. Salazar, M. O., Ramallo, I. A., Micheloni, O., González Sierra, M. y Furlan, R. L. E. **2009**. Chemically engineered extracts: Bioactivity alteration through sulfonylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 5067-5070.
20. Méndez, L., Salazar, M. O., Ramallo, I. A. y Furlan, R. L. E. **2010**. Brominated extracts as source of bioactive compounds. *ACS Combinatorial Science*, 13, 200-204.
21. Ramallo, I., Gonzalez Sierra, M. y Furlan, R. **2012**. Discovery of b-glucosidase inhibitors from a chemically engineered extract prepared through ethanolysis. *Medicinal Chemistry*, 8, 112 - 117.
22. Kikuchi, H., Sakurai, K. y Oshima, Y. **2014**. Development of diversity-enhanced extracts of curcuma zedoaria and their new sesquiterpene-like compounds. *Org. Lett.*, 16, 1916-1919.
23. Salazar, M. O., Micheloni, O., Escalante, A. M. y Furlan, R. L. E. **2011**. Discovery of a  $\beta$ -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Mol. Divers*, 15, 713-719.
24. Kirk, K. L. **2008**. Fluorination in medicinal chemistry: Methods, strategies, and recent developments. *Organic Process Research & Development*, 12, 305-321.
25. Johnson, S. M., Connelly, S., Wilson, I. A. y Kelly, J. W. **2008**. Toward optimization of the linker substructure common to transthyretin amyloidogenesis inhibitors using biochemical and structural studies†. *J. Med. Chem.*, 51, 6348-6358.
26. Wagner, C., El Omari, M. y König, G. M. **2009**. Biohalogenation: Nature's way to synthesize halogenated metabolites. *J. Nat. Prod.*, 72, 540-553.
27. Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H. y Reichel, F. **1999**. Statistical investigation into the structural complementary of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 38, 643-647.
28. Feher, M. y Schmidt, J. M. **2003**. Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43, 218-227.
29. Ortholand, J. Y. y Ganesan, A. **2004**. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8, 271-280.
30. Fenical, W., Jensen, P. R., Palladino, M. A., Lam, K. S., Lloyd, G. K. y Potts, B. C. **2009**. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide a (npi-0052). *Biorg. Med. Chem.*, 17, 2175-2180.

31. Shinde, P. B., Lee, Y. M., Dang, H. T., Hong, J., Lee, C.-O. y Jung, J. H. **2008**. Cytotoxic bromotyrosine derivatives from a two-sponge association of *Jaspis* sp. and *Poecillastra* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 6414-6418.
32. Gribble, G. W. **1998**. Naturally occurring organohalogen compounds. *Acc. Chem. Res.*, 31, 141-152.
33. Gribble, G. W. **1999**. The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.*, 28, 335-346.
34. Gribble, G. W. **2004**. Amazing organohalogens. *American Scientist.*, 92, 342.
35. Iwagawa, T., Kaneko, M., Okamura, H., Nakatani, M. y van Soest, R. W. M. **1998**. New alkaloids from papau new guinean sponge *agelas nakamurai*. *J. Nat. Prod.*, 61, 1310-1312.
36. Zabriskie, T. E., Klocke, J. A., Ireland, C. M., Marcus, A. H., Molinski, T. F., Faulkner, D. J., Xu, C. y Clardy, J. C. **1986**. Jaspamide, a modified peptide from *jaspis* sponge, with insecticidal and antifungal activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 3123-3124.
37. Rashid, M. A., Gustafson, K. R., Cartner, L. K., Shigematsu, N., Pannell, L. K. y Boyd, M. R. **2001**. Microspinosamida, a new HIV-inhibitory cyclic depsipeptide from the marine sponge *sidonops microspinosa*. *J. Nat. Prod.*, 64, 117-121.
38. Cafieri, F., Fattorusso, E. y Tagliatela-Scafati, O. **1998**. Novel bromopyrrole alkaloids from the sponge *agelas dispar*. *J. Nat. Prod.*, 61, 122-125.
39. Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S. y Gouverneur, V. **2008**. Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 320-330.
40. Swallow, S. **2015**. Fluorine in medicinal chemistry. En: Lawton, G. y Witty, D. R.(Editores). *Prog. Med. Chem.*, Elsevier, Vol. 54, pp 65-133.
41. Harsanyi, A. y Sandford, G. **2015**. Organofluorine chemistry: Applications, sources and sustainability. *Green Chemistry*, 17, 2081-2086.
42. Gribble, G. **2002**. Naturally occurring organofluorines. En: Neilson, A. H.(Editor) *Organofluorines.*, Springer Berlin Heidelberg, Vol. 3, pp 121-136.
43. Deng, H., O'Hagan, D. y Schaffrath, C. **2004**. Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from *streptomyces cattleya*. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 773-784.
44. Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L. y Orešič, M. **2011**. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. *Chemometrics Intellig. Lab. Syst.*, 108, 23-32.
45. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W., Harrigan, G. y Kell, D. **2004**. Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.*, 22, 245-252.

46. Sugimoto, M., Kawakami, M., Robert, M., Soga, T. y Tomita, M. **2012**. Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. *Curr Bioinform.*, 7, 96-108.
47. Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J. y Vikström, C. **2013**. PCA. En *Multi- and megavariate data analysis basic principles and applications* MKS Umetrics AB, Umeå.
48. Marston, A. **2011**. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A*, 1218, 2676-2683.
49. Goodall, R. R. y Levi, A. A. **1946**. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*, 158, 675-676.
50. Fisher, R. y Lautner, H. **1961**. On the paper chromatographic detection of penicillin preparations. *Arch. Pharm.*, 294, 1-7.
51. Nicolaus, B. J. R., Coronelli, C. y Binaghi, A. **1961**. Applicazione agli antibiotici della cromatografia su strato soltile. *Farmaco*, 16, 349-370.
52. Rios, J. L., Recio, M. C. y Villar, A. **1988**. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J. Ethnopharmacol.*, 23, 127-149.
53. Choma, I. **2005**. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. *LCGC Europe*, 18, 482-488.
54. Salazar, M. O., Viarengo, G., Sciara, M. I., Kieffer, P. M., Garcia Vescovi, E. y Furlan, R. L. E. **2014**. A thin-layer chromatography autographic method for the detection of inhibitors of the salmonella PhoP–PhoQ regulatory system. *Phytochem. Anal*, 25, 155-160.
55. Morlock, G. E. y Klingelhöfer, I. **2014**. Liquid chromatography-bioassay-mass spectrometry for profiling of physiologically active food. *Anal. Chem.*, 86, 8289-8295.
56. Choma, I. M. y Grzelak, E. M. **2011**. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218, 2684-2691.
57. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. y Featherstone, R. M. **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
58. Rhee, I. K., van Rijn, R. M. y Verpoorte, R. **2003**. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem. Anal*, 14, 127–131.
59. Mroczek, T. y Mazurek, J. **2009**. Pressurized liquid extraction and anticholinesterase activity-based thin-layer chromatography with bioautography of amaryllidaceae alkaloids. *Anal. Chim. Acta*, 633, 188-196.
60. Marston, A., Kissling, J. y Hostettmann, K. **2002**. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal.*, 13, 51–54.

61. Ramallo, I. A., Salazar, M. O. y Furlan, R. L. E. **2015**. Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: Accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 26, 404-412.
62. Hassan, A. M. S. **2012**. TLC bioautographic method for detecting lipase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 23, 405-407.
63. Bayineni, V. K., Suresh, S., Singh, G. y Kadeppagari, R.-K. **2014**. Development of a bioautographic method for the detection of lipase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 453, 784-786.
64. Wangthong, S., Tonsiripakdee, I., Monhaphol, T., Nonthabenjawan, R. y Wanichwecharungruang, S. P. **2007**. Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomed. Chromatogr.*, 21, 94-100.
65. Salazar, M. O. y Furlan, R. L. E. **2007**. A rapid tlc autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 18, 209-212.
66. Simões-Pires, C. A., Hmicha, B., Marston, A. y Hostettmann, K. **2009**. A TLC bioautographic method for the detection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase inhibitors in plant extracts. *Phytochem. Anal.*, 20, 511-515.
67. Ramallo, I. A., Zacchino, S. A. y Furlan, R. L. E. **2006**. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochem. Anal.*, 17, 15-19.
68. Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. y Lobo, V. **2010**. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Vol. 4, p 118-126.
69. Aruoma, O. I. **1999**. Antioxidant actions of plant foods: Use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.*, 30, 419-427.
70. Willcox, J. K., Ash, S. L. y Catignani, G. L. **2004**. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 275-295.
71. Moore, J., Liu, J.-G., Zhou, K. y Yu, L. **2006**. Effects of genotype and environment on the antioxidant properties of hard winter wheat bran. *J. Agric. Food. Chem.*, 54, 5313-5322.
72. Wettasinghe, M., Shahidi, F. y Amarowicz, R. **2002**. Identification and quantification of low molecular weight phenolic antioxidants in seeds of evening primrose (*oenothera biennis* L.). *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 1267-1271.
73. Molyneux, P. **2004**. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26, 211-219.
74. Blois, M. S. **1958**. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
75. Kedare, S. B. y Singh, R. P. **2011**. Genesis and development of dpph method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48, 412-422.

76. McGinnis, B. D., Adams, V. D. y Middlebrooks, E. J. **1999**. Evaluation of methylene blue and riboflavin for the photosensitized degradation of ethylene glycol. *Environment International*, 25, 953-959.
77. Cardoso, D. R., Libardi, S. H. y Skibsted, L. H. **2012**. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food & Function*, 3, 487-502.
78. Lillelund, V. H., Jensen, H. H., Liang, X. y Bols, M. **2002**. Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin. *Chem. Rev.*, 102, 515-553.
79. Asano, N., Kato, A. y Watson, A. A. **2001**. Therapeutic applications of sugar-mimicking glycosidase inhibitors. *Mini Rev Med Chem*, 1, 145-154.
80. Wagman, A. S. y Nuss, J. M. **2001**. Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes. *Curr. Pharm. Des.*, 7, 417-450.
81. Wen, Y. M., Lin, X. y Ma, Z. M. **2003**. Exploiting new potential targets for anti-hepatitis b virus drugs. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 3, 241-246.
82. Robina, I., Moreno-Vargas, A. J., Carmona, A. T. y Vogel, P. **2004**. Glycosidase inhibitors as potential hiv entry inhibitors? *Curr Drug Metab*, 5, 329-361.
83. Asano, N., Ikeda, K., Kasahara, M., Arai, Y. y Kizu, H. **2004**. Glycosidase-inhibiting pyrrolidines and pyrrolizidines with a long side chain in scilla peruviana. *J. Nat. Prod.*, 67, 846-850.
84. Asano, N., Kizu, H., Oseki, K., Tomioka, E., Matsui, K., Okamoto, M. y Baba, M. **1995**. N-alkylated nitrogen-in-the-ring sugars: Conformational basis of inhibition of glycosidases and hiv-1 replication. *J. Med. Chem.*, 38, 2349-2356.
85. Krall, W. J., Sramek, J. J. y Cutler, N. R. **1999**. Cholinesterase inhibitors: A therapeutic strategy for alzheimer disease. *Ann. Pharmacother.*, 33, 441-450.
86. Di Lazzaro, V., Oliviero, A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M., Marra, C., Ghirlanda, S., Ranieri, F., Gainotti, G. y Tonali, P. **2005**. Neurophysiological predictors of long term response to ache inhibitors in ad patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 76, 1064-1069.
87. Rhee, I. K., Van de Meent, M., Ingkaninan, K. y Verpoorte, R. **2001**. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chrom. A*, 915, 217-223.
88. Ramallo, I. A., Salazar, M. O. y Furlán, R. L. E. Resultados no publicados.
89. McCord, J. M. **1985**. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312, 159-163.
90. Hearse, D. J., Manning, A. S., Downey, J. M. y Yellon, D. M. **1986**. Xanthine oxidase: A critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 548, 65-78.

91. Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J. y Berghe, D. V. **1998**. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, 61, 71-76.
92. Sánchez-Ferrer Á., R.-L. J. N., García-Cánovas F. and García-Carmona F. **1995**. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1247, 1–11.
93. Rodríguez-López, J. N., Tudela, J., Varón, R., García-Carmona, F. y García-Cánovas, F. **1992**. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 261, 3801-3810.
94. Kim, Y. J. y Uyama, H. **2005**. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 1707-1723.
95. Martínez, M. V. y Whitaker, J. R. **1995**. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 195-200.
96. Sugumaran, M. **1991**. Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis: Comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Lett.*, 295, 233-239.
97. García-Molina, F., Muñoz, J. L., Varón, R., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F. y Tudela, J. **2007**. A review on spectrophotometric methods for measuring the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 9739-9749.
98. Land, E. J. y Riley, P. A. **2000**. Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. *Pigment Cell Res.*, 13, 273-277.
99. Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M. y Frenk, E. **1991**. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.*, 2, 199-203.
100. Plackett, R. L. y Burman, J. P. **1946**. "The design of optimal multifactorial experiments". *Biometrika*, 33, 305-325.
101. Lewis, G., Mathieu, D. y Phan-Tan-Luu, R. **1999**. *Pharmaceutical experimental design*. Marcel Dekker Inc: New York.
102. Mandal, P. K. **2012**. Predictive biomarkers for alzheimer's disease using state-of-the-art brain imaging techniques. *Journal of Alzheimer's Disease*, 31, S1-S3.
103. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. y Houghton, P. J. **2007**. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 14, 289-300.
104. De-Paula, V., Radanovic, M., Diniz, B. S. y Forlenza, O. V. **2012**. Alzheimer's disease. En *Protein aggregation and fibrillogenesis in cerebral and systemic amyloid disease*, Harris, J. R., Ed. Springer Netherlands, Vol. 65, pp 329-352.

105. Gauthier, S. y Scheltens, P. Can we do better in developing new drugs for alzheimer's disease? *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 5, 489-491.
106. Santaladchaiyakit, Y., Srijaranai, S. y Burakham, R. **2012**. Methodological aspects of sample preparation for the determination of carbamate residues: A review. *J. Sep. Sci.*, 35, 2373-2389.
107. Miao, Y., He, N. y Zhu, J.-J. **2010**. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.*, 110, 5216-5234.
108. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres jr, V. y Featherstone, R. M. **1961**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
109. van Asperen, K. **1962**. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.*, 8, 401-416.
110. Hostettmann, K., Borloz, A., Urbain, A. y Marston, A. **2006**. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. *Curr. Org. Chem.*, 10, 825-847.
111. Mroczek, T. **2009**. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2519-2528.
112. Yang, Z., Zhang, X., Duan, D., Song, Z., Yang, M. y Li, S. **2009**. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *J. Sep. Sci.*, 32, 3257-3259.
113. Yang, Z.-D., Song, Z.-W., Ren, J., Yang, M.-J. y Li, S. **2011**. Improved thin-layer chromatography bioautographic assay for the detection of actylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Anal*, 22, 509-515.
114. Spangenberg, B., Poole, C. y Weins, C. **2011**. Specific staining reactions. *En Quantitative thin-layer chromatography*, Springer Berlin Heidelberg, pp 155-200.
115. Pohanka, M., Hrabínova, M., Kuca, K. y Simonato, J.-P. **2011**. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard ellman's method. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2631-2640.
116. Guilbault, G. G. y Kramer, D. N. **1965**. Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Anal. Chem.*, 37, 120-123.
117. Pohanka, M. **2012**. Acetylcholinesterase based dipsticks with indoxylacetate as a substrate for assay of organophosphates and carbamates. *Anal. Lett.*, 45, 367-374.
118. Bohorquez, M., Koch, C., Trygstad, T. y Pandit, N. **1999**. A study of the temperature-dependent micellization of pluronic f127. *J. Colloid Interface Sci.*, 216, 34-40.

119. Ruel-Gariépy, E. y Leroux, J.-C. **2004**. In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58, 409-426.
120. Şahin, F., Demirel, G. y Tümtürk, H. **2005**. A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 37, 148-153.
121. Chaiyana, W. y Okonogi, S. **2012**. Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant. *Phytomedicine*, 19, 836-839.
122. Chaiyana, W., Saeio, K., Hennink, W. E. y Okonogi, S. **2010**. Characterization of potent anticholinesterase plant oil based microemulsion. *Int. J. Pharm.*, 401, 32-40.
123. Cacchi, S., Caglioti, L. y Cernia, E. **1979**. Polymer supported bromine; a new reagent for the  $\alpha$ -bromination of ketones. *Synthesis*, 1, 64-66.
124. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. y Oresic, M. **2010**. Mzmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11, 1-11.
125. Kowalski, B. R. y Bender, C. F. **1973**. Pattern recognition. Ii. Linear and nonlinear methods for displaying chemical data. *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 686-693.
126. Cloarec, O., Dumas, M. E., Trygg, J., Craig, A., Barton, R. H., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. y Holmes, E. **2004**. Evaluation of the orthogonal projection on latent structure model limitations caused by chemical shift variability and improved visualization of biomarker changes in 1h nmr spectroscopic metabonomic studies. *Anal. Chem.*, 77, 517-526.
127. Cloarec, O., Dumas, M.-E., Craig, A., Barton, R. H., Trygg, J., Hudson, J., Blancher, C., Gauguier, D., Lindon, J. C., Holmes, E. y Nicholson, J. **2005**. Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1h nmr data sets. *Anal. Chem.*, 77, 1282-1289.
128. Gartland, K. P. R., Sanins, S. M., Nicholson, J. K., Sweatman, B. C., Beddell, C. R. y Lindon, J. C. **1990**. Pattern recognition analysis of high resolution 1h nmr spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed.*, 3, 166-172.
129. Choi, Y. H., Kim, H. K., Hazekamp, A., Erkelens, C., Lefeber, A. W. M. y Verpoorte, R. **2004**. Metabolomic differentiation of cannabis sativa cultivars using 1h nmr spectroscopy and principal component analysis. *J. Nat. Prod.*, 67, 953-957.
130. Viant, M. R. Matlabtm code for processing metabolite profiles derived from nmr spectra release 1.1. (December 2004).
131. Daszykowski, M., Serneels, S., Kaczmarek, K., Van Espen, P., Croux, C. y Walczak, B. **2007**. Tomcat: A matlab toolbox for multivariate calibration techniques. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 85, 269-277.
132. Ramallo, I. A., Salazar, M. O. y Furlan, R. **2015**. Thin layer chromatography-autography-high resolution mass spectrometry analysis: Accelerating the identification of acetylcholinesterase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 26, 404-412.

133. Ramallo, I. A., Zacchino, S. A. y Furlan, R. L. **2006**. A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochem. Anal.*, 17, 15-19.
134. Edris, A. E. **2007**. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.*, 21, 308-323.
135. Maffei, M. E., Gertsch, J. y Appendino, G. **2011**. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Nat. Prod. Rep.*, 28, 1359-1380.
136. Jiang, Q., Sheng, W. y Guo, C. **2013**. Synthesis of phenacyl bromides via  $k_2s_2o_8$ -mediated tandem hydroxybromination and oxidation of styrenes in water. *Green Chemistry*, 15, 2175-2179.
137. Moorthy, J. N., Senapati, K. y Singhal, N. **2009**. An expedient protocol for conversion of olefins to  $\alpha$ -bromo/iodoketones using *ibx* and *nbs/nis*. *Tetrahedron Lett.*, 50, 2493-2496.
138. Boyes, S. A. y Hewson, A. T. **2000**. Enantioselective synthesis of [small  $\alpha$ ]-bromo acid derivatives and bromohydrins from tartrate derived bromoacetals. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2759-2765.
139. Atta-ur-Rahman, Choudhary, I. y Thomsen, W. J. **2001**. Enzyme assays. En *Bioassay techniques for drug development*, Taylor & Francis, pp 128-130.
140. Singh, R. P. y Shreeve, J. n. M. **2004**. Recent highlights in electrophilic fluorination with 1-chloromethyl-4-fluoro- 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane bis(tetrafluoroborate). *Acc. Chem. Res.*, 37, 31-44.
141. Banks, R. E. **1998**. Selectfluor™ reagent f-teda-bf<sub>4</sub> in action: Tamed fluorine at your service. *J. Fluorine Chem.*, 87, 1-17.
142. Nyffeler, P. T., Durón, S. G., Burkart, M. D., Vincent, S. P. y Wong, C. H. **2005**. Selectfluor: Mechanistic insight and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 192-212.
143. Chambers, R. D., Parsons, M., Sandford, G. y Bowden, R. **2000**. Electrophilic fluorination at saturated sites. *Chem. Commun.*, 959-960.
144. García, P. y Furlan, R. L. E. **2015**. Multiresponse optimisation applied to the development of a TLC autography for the detection of tyrosinase inhibitors. *Phytochem. Anal.*, 26, 287-292.
145. Obolskiy, D., Pischel, I., Feistel, B., Glotov, N. y Heinrich, M. **2011**. *Artemisia dracunculus* L. (tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *J. Agric. Food. Chem.*, 59, 11367-11384.
146. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. y Anackov, G. **2006**. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food. Chem.*, 54, 1822-1828.

147. Pravst, I. y Stavber, S. **2013**. Fluorination of 4-alkyl-substituted phenols and aromatic ethers with fluoroxy and n-f reagents: Cesium fluoroxy sulfate and n-fluoro-1,4-diazonia-bicyclo[2.2.2]octane dication salts case. *J. Fluorine Chem.*, 156, 276-282.
148. Wagner, H. y Blatt, S. **1996**. Plant drug analysis. A thin chromatography atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
149. Bongini, A., Cainelli, G., Contento, M. y Manescalchi, F. **1980**. Anion-exchange resins as halogen carriers in the bromination and chlorobromination of organic compounds. *Synthesis*, 2, 143-146.
150. Chu, Y.-H., Chen, C.-J., Wu, S.-H. y Hsieh, J.-F. **2014**. Inhibition of xanthine oxidase by *rhodiola crenulata* extracts and their phytochemicals. *J. Agric. Food. Chem.*, 62, 3742-3749.
151. Di Giovanni, S., Borloz, A., Urbain, A., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A. y Reist, M. **2008**. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 33, 109-119.