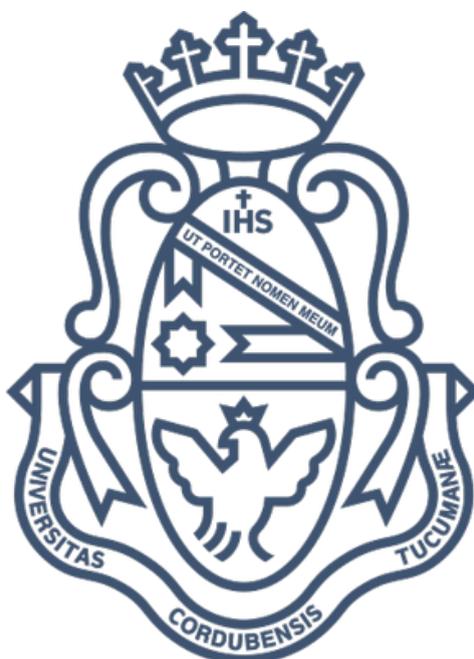


Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**Diseño y desarrollo de nuevos fármacos
para el tratamiento de
enfermedades infecciosas desatendidas**



Farm. Camila Mara Clemente

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas

Córdoba, Argentina.

2022

Diseño y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas desatendidas

TRABAJO DE TESIS PARA ACCEDER AL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Farm. Camila Mara Clemente

DIRECTORES

Prof. Dr. Daniel A. Allemandi

Prof. Dr. Lisandro Y. Hergert

COMISIÓN ASESORA

Prof. Dra. Soledad Ravetti

Prof. Dra. María del Pilar Aoki

Prof. Dra. Sandra E. Martín

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dra. Nancy Roxana Vera

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba e Instituto de Investigación de la Universidad Nacional de Villa María.

A la memoria de papá y Flor.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mis agradecimientos a la **Dra. Soledad Ravetti**, por brindarme la oportunidad de descubrir el interesante mundo de la investigación, por guiarme en él, por su paciencia desde aquel cursillo de ingreso de la FCQ, por todas sus enseñanzas, por su bondad, por su dedicación constante, por confiar en mí y por apoyarme siempre en mis decisiones académicas y personales. También, agradecerte por aceptar ser miembro propuesto de mi comisión asesora, tus aportes fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo de Tesis. Inmensamente gracias.

A mis directores, los **Dres. Lisandro Hergert** y **Daniel Allemandi** que me abrieron las puertas de mis dos queridas universidades: Universidad Nacional de Villa María y Universidad Nacional de Córdoba. Gracias por la libertad que me brindaron para ir eligiendo mi propio camino y apoyarme en las decisiones que se iban presentando.

Agradezco a los miembros de la comisión asesora, las **Dras. María del Pilar Aoki** y **Sandra Martín** por sus importantes aportes en este trabajo de Tesis a lo largo de todo mi doctorado y sobre todo por haberse dedicado a leer y corregir el manuscrito final. A la **Dra. Nancy Roxana Vera** por haber aceptado participar como evaluadora externa del presente trabajo doctoral.

A los **Dres. Santiago Palma** y **Walter Rivarola**, por brindarme siempre el espacio y tiempo para desarrollar nuevas ideas y propuestas científicas. A la **Dra. Gloria Bonetto** por su gran ayuda con mis largos análisis de RMN.

Al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquía en Colombia y a la **Dra. Sara Robledo** debido a la oportunidad que me brindaron para trabajar junto a ellos, por su gran calidez humana y por toda la ayuda brindada.

También, agradecer al Centro de Computación de Alto Desempeño de la UNC y a su director, el **Dr. Nicolás Wolovick** que con su buena predisposición siempre supo resolver y aconsejarme en todo momento sobre cada inconveniente informático que se me presentaba.

A **Sofía, Ayelén, Franco** y **Ariel**, amigos en lo personal y grandes compañeros de mesada. Gracias por brindarme su apoyo incondicionalmente. A **María**, por introducirme en el mundo de la Bioinformática, agradezco tu predisposición, aliento y paciencia infinita. Al resto de los

miembros del departamento de Ciencias Farmacéuticas de la UNC y del IMITAB de la UNVM, por su constante colaboración y ayuda.

A mi familia y amigos, por acompañarme y alegrarse siempre de mis logros.

A las entidades que han colaborado y brindado el soporte económico para el desarrollo de esta Tesis Doctoral: CONICET, MINCyT de la provincia de Córdoba, Instituto de Investigación y Secretaria de Internacionalización de la UNVM por las becas y/o subsidios otorgados.

Al **pueblo argentino**, por financiar a través de sus impuestos mi educación primaria, secundaria, universitaria y de posgrado.

¡A todos por hacer de esta oportunidad, una historia llena de agradecimientos con nombre propio!

RESUMEN

El presente trabajo de Tesis aborda el diseño y desarrollo de nuevas prodrogas de Mentol, Timol y Eugenol, con el objetivo de generar propuestas para la farmacoterapia de las enfermedades de Chagas, Leishmaniasis y Malaria. La investigación realizada se enmarca dentro del área de la Química Medicinal, la cual apunta a la síntesis, identificación y el desarrollo de nuevas moléculas con utilidad terapéutica.

Así, en el Capítulo I se presenta una breve introducción de los aspectos teóricos relacionados con la problemática de la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria, enfermedades consideradas como Enfermedades Infecciosas Desatendidas (EIDs). Como así también, se presentan las bases que fundamentan el desarrollo de las prodrogas para optimizar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos naturales. Luego, en el Capítulo II se establecen los objetivos y lineamientos generales de este trabajo de Tesis Doctoral.

En una primera etapa, se diseñaron 27 nuevos derivados del Mentol, Timol y Eugenol (**1a-i**, **2a-i** y **3a-i**) utilizando como complemento molecular diferentes alcoholes alifáticos a través de una unión carbonato. Los mismos fueron sometidos a diferentes filtros del tipo “*drug-likeness*” y una evaluación de similitud estructural (Capítulo III). Luego, los nuevos derivados fueron sintetizados y caracterizados estructuralmente utilizando técnicas espectroscópicas ampliamente aceptadas para la identificación y determinación de la estructura química (Capítulo IV).

Teniendo en cuenta que la estabilidad química es esencial durante el desarrollo preclínico de prodrogas, se analizaron estos ensayos como parte del Capítulo V. A su vez, un requisito fundamental para que un fármaco ejerza su efecto terapéutico es lograr atravesar membranas biológicas. Es por ello que realizamos ensayos de permeabilidad *in silico* e *in vitro* (Capítulo VI).

En el Capítulo VII se describe la evaluación de los efectos tóxicos *in vitro* de las nuevas prodrogas sintetizadas y de los compuestos de partida sobre líneas celulares U-937. En relación a la actividad antiprotozoaria *in vitro* se midió frente a *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* y *Plasmodium falciparum*.

Finalmente, a través de estudios de simulaciones de dinámica molecular se exploraron diferentes parámetros que permitieron predecir la posibilidad de unión del Mentol, Timol y Eugenol en el sitio de unión al sustrato de las enzimas dihidroorotato deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), *Leishmania braziliensis* (LbDHODH) y de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) (Capítulo VIII).

Sobre la base de los resultados mostrados en las secciones anteriores, en el Capítulo IX se resumen las conclusiones generales del trabajo realizado y se plantean una serie de proyecciones en el contexto de la continuidad del desarrollo preclínico de esta investigación.

En el Capítulo X se muestran los trabajos publicados y presentados a la comunidad científica realizados en el marco de esta Tesis Doctoral.

SUMMARY

The thesis project approaches the design and development of new Menthol, Thymol and Eugenol prodrugs, with the aim of proposing new drugs for the pharmacotherapy of Chagas, Leishmaniasis and Malaria diseases. The research developed is focused on the area of Medicinal Chemistry, which aims at the synthesis, identification and development of new molecules with therapeutic utility.

Thus, Chapter I presents a brief introduction of the theoretical aspects related to the problems of Chagas, Leishmaniasis and Malaria diseases, all of them considered as Neglected Infectious Diseases (NIDs). The basis for the development of prodrugs to optimize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of natural compounds is also presented. Then, in Chapter II, the objectives and general lines of this PhD thesis are established.

First, 27 new prodrugs of Menthol, Thymol and Eugenol (**1a-i**, **2a-i** and **3a-i**) were designed using different aliphatic alcohols as molecular complements by carbonate linkage. They were submitted to different drug-likeness filters and an evaluation of structural similarity (Chapter III). The new derivatives were synthesized and structurally characterized using well accepted spectroscopic techniques for the identification and determination of the chemical structure (Chapter IV).

Considering that chemical stability is essential during the preclinical development of drugs, these assays were analyzed as part of Chapter V. A fundamental requirement for a drug to be able to achieve its therapeutic effect is to be able to cross biological membranes. For this reason, we performed *in silico* and *in vitro* permeability assays (Chapter VI).

Chapter VII describes the evaluation of the *in vitro* toxic effects of the new synthesized prodrugs and parent compounds on U-937 cell lines. *In vitro* antiprotozoal activity was measured against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Plasmodium falciparum*.

Finally, through molecular dynamics simulation studies, different parameters were explored to predict the potential binding of Menthol, Thymol and Eugenol to the substrate binding site of the dihydroorotate dehydrogenase enzymes of *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), *Leishmania braziliensis* (LbDHODH) and *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) (Chapter VIII).

On the basis of the results, Chapter XI summarizes the general conclusions of the work performed and presents a series of future projections in the context of the continued preclinical development

of this research. Chapter X shows the work published and presented to the scientific community produced as part of this PhD thesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
CAPÍTULO I: Introducción	16
1.1. Química Medicinal	16
1.1.1. Búsqueda de nuevos fármacos	19
1.1.1.1. Prodrogas	19
1.1.1.2. Compuestos naturales	22
1.1.1.2.1. Mentol, Timol y Eugenol	23
1.2. Enfermedades Infecciosas Desatendidas	26
1.2.1. Chagas	27
1.2.2. Leishmaniasis	30
1.2.3. Malaria	32
CAPÍTULO II: Objetivos y lineamientos generales	44
CAPÍTULO III: Diseño de nuevos derivados de Mentol, Timol y Eugenol	45
2.1. Consideraciones generales	45
2.1.2. Quimioinformática	46
2.1.1.1. Filtros “ <i>drug-likeness</i> ”	47
2.1.1.2. Análisis del espacio químico	48
2.2. Objetivos	49
2.2.1. Objetivo general	49
2.2.2. Objetivos específicos	49
2.3. Resultados	49
2.3.1. Diseño de prodrogas del Mentol, Timol y Eugenol	49
2.3.2. Filtros “ <i>drug-likeness</i> ”	52
2.3.3. Análisis del espacio químico	54
2.3.3.1. Análisis del espacio químico para compuestos con actividad antiparasitaria	56
2.4. Discusión y conclusiones parciales	62

2.5. Sección experimental	63
2.5.1. Filtros “ <i>drug-likeness</i> ”	63
2.5.2. Análisis del espacio químico	63
2.6. Bibliografía	66

CAPÍTULO IV: Síntesis y elucidación estructural de nuevos derivados del Mentol,

Timol y Eugenol **72**

3.2. Objetivos	72
3.2.1. Objetivo general	72
3.2.2. Objetivos específicos	73
3.3. Resultados y discusión	73
3.3.1. Síntesis de carbonatos de Mentol, Timol y Eugenol	73
3.3.2. Determinación de la estructura química	76
3.3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear de Protones	78
3.3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono	79
3.3.2.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	79
3.3.2.4. Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV)	79
3.3.2.5. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS)	80
3.4. Conclusiones parciales	80
3.5. Sección experimental	81
3.5.1. Materiales y equipos	81
3.5.2. Método general de síntesis	81
3.6. Bibliografía	97

CAPÍTULO V: Estudios de estabilidad química **100**

4.1. Consideraciones Generales	100
4.2. Objetivos	102
4.2.1. Objetivo general	102
4.2.2. Objetivos específicos.	102
4.3. Resultados	102
4.3.1. Degradación forzada	102
4.3.2. Selección y validación del método analítico	105
4.3.2.1. Selectividad	105
4.3.2.2. Linealidad y Calibración	106

4.3.2.3. Precisión	107
4.3.2.4. Exactitud	107
4.3.2.5. Sensibilidad	108
4.3.3. Degradación acelerada	110
4.4. Discusión	115
4.5. Conclusiones parciales	116
4.6. Sección experimental	116
4.6.1. Materiales y equipos	116
4.6.2. Estabilidad química	117
4.7. Bibliografía	118
CAPÍTULO VI: Estudios de permeabilidad a través de un modelo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	121
5.1. Consideraciones generales	121
5.1.1. Difusión de fármacos a través de membranas biológicas	122
5.1.2. Métodos para la evaluación de la permeabilidad de fármacos	123
5.2. Objetivos	125
5.2.1. Objetivo general	125
5.2.2. Objetivos específicos	125
5.3. Resultados	126
5.3.1. Predicción de permeación pasiva de la membrana a través de estudios <i>in silico</i>	126
5.3.2. Membrana artificial biomimética (MAB)	129
5.3.3. Estudio de permeabilidad <i>in vitro</i>	131
5.4. Discusión	132
5.5. Conclusiones parciales	134
5.6. Sección experimental	134
5.6.1. Predicción de permeación pasiva de la membrana a través de estudios <i>in silico</i>	134
5.6.2. Estudios de permeabilidad <i>in vitro</i>	134
5.6.2.1. Membrana artificial biomimética	134
5.7. Bibliografía	136
CAPÍTULO VII: Efectividad y citotoxicidad <i>in vitro</i> de las prodrogas diseñadas en <i>T. cruzi</i>, <i>L. braziliensis</i> y <i>P. falciparum</i>	142
6.1. Consideraciones generales	142
6.2. Objetivos	143

6.2.1. Objetivo general	143
6.2.2. Objetivos específicos	143
6.3. Resultados y discusión	143
6.3.1. Prodrogas del Mentol (1a-i)	143
6.3.2. Prodrogas del Timol (2a-i)	147
6.3.3. Prodrogas del Eugenol (3a-i)	149
6.4. Discusión y conclusiones parciales	151
6.5. Sección experimental	152
6.5.1. Actividad citotóxica en células U-937 <i>in vitro</i>	152
6.5.2. Actividad tripanocida <i>in vitro</i>	153
6.5.3. Actividad leishmanicida <i>in vitro</i>	153
6.5.4. Actividad antiplasmodial <i>in vitro</i>	154
6.5.5. Análisis de datos	155
6.6. Bibliografía	156

CAPÍTULO VIII: Identificación de un nuevo blanco terapéutico a través de estudios *in silico* **158**

7.1. Consideraciones Generales	158
7.1.1. Química Computacional	158
7.1.2. Dihidroorotato deshidrogenasa	159
7.2. Objetivos	162
7.2.1. Objetivo general	162
7.2.2. Objetivos específicos	162
7.3. Resultados	162
7.3.1. Análisis de la secuencia aminoacídica y estructura proteica de TcDHODH, LbDHODH y PfDHODH	162
7.3.2. Acoplamiento molecular (Molecular Docking)	165
7.3.3. Simulaciones de dinámica molecular	167
7.3.3.1. RMSD y RMSF	168
7.3.3.2. Cálculos de energía libre de unión	172
7.3.3.3. Contribución energética de los residuos implicados en la unión ligando-proteína.	175
7.4. Discusión	178
7.5. Conclusiones parciales	179

7.6. Sección experimental	180
7.6.1. Análisis de la secuencia y estructura de TcDHODH, LbDHODH y PfdHODH	180
7.6.2. Acoplamiento molecular	180
7.6.2.1. Preparación de ligandos	180
7.6.2.2. Preparación de proteínas	180
7.6.2.3. Acoplamiento molecular y visualización	181
7.6.2.4. RMSD	181
7.6.3. Simulaciones de dinámica molecular	181
7.6.3.1. Programas para dinámica molecular utilizados	181
7.6.3.2. RMSD y RMSF	183
7.6.3.3. Cálculos de energía libre de unión	183
7.7. Bibliografía	184
CAPÍTULO IX: Conclusiones y perspectivas	192
CAPÍTULO X: Producción científica	195
Anexo I: Resultados de Resonancia Magnética Nuclear	200
Anexo II: Resultados de Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier	211
Anexo III: Resultados de Espectroscopía de Masas de Alta Resolución	226

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversas disciplinas relacionadas con la Química Medicinal.

Figura 2. Proceso de investigación y desarrollo de un fármaco. Figura adaptada de la referencia Hill & Richards (2021) [5].

Figura 3. Bioactivación *in vivo* de prodrogas mediante transformaciones enzimáticas y/o químicas. Figura adaptada de la referencia Jornada y colaboradores (2015).

Figura 4. Estructuras químicas del Mentol, Timol y Eugenol.

Figura 5. Número de EIDs presentes por país según las estimaciones de la OMS. Figura adaptada de la OMS [60].

Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

Figura 7. Estructuras de (A) medicamentos actuales y (B) potenciales agentes tripanocidas propuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Figura 8. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

Figura 9. Estructuras de medicamentos actuales para el tratamiento de Leishmaniasis.

Figura 10. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>)

Figura 11. Estructuras de medicamentos actuales para el tratamiento de Malaria.

Figura 12. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo); Timol y **2a-i** (azul); Eugenol y **3a-i** (verde).

Figura 13. A. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo), Timol y **2a-i** (azul) y Eugenol y **3a-i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox (amarillo), Benznidazol (marrón), Posaconazol (negro), Ravuconazol (cyan) y Fexinidazol (gris). B. Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la enfermedad de Chagas.

Figura 14. A. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo), Timol y **2a-i** (azul) y Eugenol y **3a-i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la Leishmaniasis: Miltefosina (amarillo), Anfotericina B (negro), Antimoniato de meglumina (cyan), Paromomicina (marrón) y Estiboglucanato de sodio (gris). B. Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la Leishmaniasis.

Figura 15. A. Gráfico 3D del espacio químico de Mentol y **1a-i** (rojo), Timol y **2a-i** (azul) y Eugenol y **3a-i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la Malaria: Artemisina (marrón), Atovaquona (cyan), Cloroquina (amarillo), Doxiciclina (lila), Mefloquina (gris), Primaquina (negro) y Proguanil (magenta). B. Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la Malaria.

Figura 16. Reacción general para la formación de carbonatos de Mentol.

Figura 17. Reacción general para la formación de carbonatos de Timol.

Figura 18. Reacción general para la formación de carbonatos de Eugenol.

Figura 19. Mentol y compuestos **1a-i**.

Figura 20. Timol y compuestos **2a-i**.

Figura 21. Eugenol y compuestos **3a-i**.

Figura 22. Espectros UV. A. Timol y derivados. B. Eugenol y derivados.

Figura 23. Esquema de las etapas de un estudio de estabilidad.

Figura 24. Cromatogramas de degradación forzada a pH 1,2 a 60°C luego de 72 h. A. Cromatograma de CG del compuesto **1e**. B. Cromatograma de HPLC del compuesto **2g**. C. Cromatograma de HPLC del compuesto **3e**.

Figura 25. Cromatograma de gases de degradación acelerada de **1e** luego de 60 min. A. pH 1,2. B. pH 5,8. C. pH 7,4.

Figura 26. Cromatogramas de degradación acelerada de **2g** luego de 60 min. A. pH 1,2. B. pH 5,8. C. pH 7,4.

Figura 27. Cromatogramas de degradación acelerada de **3e** luego de 60 min. A. pH 1,2. B. pH 5,8. C. pH 7,4.

Figura 28. Cinética de degradación de pseudo primer orden de **1e** en soluciones acuosas a diferentes valores de pH's.

Figura 29. Reacción general de hidrólisis de los carbonatos de Mentol, Timol y Eugenol.

Figura 30. Mecanismo de hidrólisis catalizada por ácido.

Figura 31. Mecanismo de hidrólisis catalizada por base.

Figura 32. Estructura de la membrana celular.

Figura 33. Mecanismos de transporte celular.

Figura 34. Estructura química de los compuestos seleccionados.

Figura 35. Perfiles de energía calculados para los compuestos a medida que se desplazan por la bicapa de DOPC. A. Mentol y sus prodrogas. B. Timol y sus prodrogas. C. Eugenol y sus prodrogas.

Figura 36. Esquema de una celda de difusión de Franz horizontal y fotografía de las celdas utilizadas en este ensayo (por triplicado) y con el correspondiente circuito de agua.

Figura 37. Índice de selectividad del Mentol y sus prodrogas. En asteriscos (*) se marcan los compuestos que no se logró cuantificar la actividad biológica con exactitud.

Figura 38. Índice de selectividad del Timol y sus prodrogas.

Figura 39. Índice de selectividad del Eugenol y sus prodrogas. En asteriscos (*) se marcan los compuestos que no se logró cuantificar la actividad biológica con exactitud.

Figura 40. DHODH cataliza dos semirreacciones reversibles. En la primera mitad de la reacción redox, la (S)-Dihidroorotato es oxidada por el cofactor FMN. En la segunda, el grupo prostético FMN es reoxidado por fumarato o NAD⁺ en la DHODH de Clase 1 o ubiquinonas (CoQn) en las variantes mitocondriales de la DHODH de Clase 2.

Figura 41. Estructuras de las proteínas.

Figura 42. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de PfDHODH (PDB ID: 4CQA), TcDHODH (PDB ID: 2E68) y LbDHODH (PDB ID: 4WZH). En lila se encuentran remarcados las posiciones del alineamiento en cuales la identidad del aminoácido coinciden entre las proteínas.

Figura 43. Alineamiento estructural de A. TcDHODH (verde) y LbDHODH (rosa) B. TcDHODH (verde), LbDHODH (rosa) y PfDHODH (celeste).

Figura 44. Esquema representativo de las 12 simulaciones realizadas.

Figura 45. RMSD del backbone de las proteínas y de los ligandos en complejos simulados. En amarillo corresponde al complejo con el sustrato natural (S-dihidroorotato), en rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

Figura 46. RMSF del backbone de las proteínas en complejo simuladas. En amarillo corresponde al complejo con el sustrato natural (S-dihidroorotato), en rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

Figura 47. Contribución energética por residuo. A. TcDHODH B. LbDHODH C. PfDHODH. En rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

Figura A1.1. RMN-¹H Mentol (1).

Figura A1.2. RMN-¹H compuesto 1a.

Figura A1.3. RMN-¹H compuesto 1b.

Figura A1.4. RMN-¹H compuesto 1c.

Figura A1.5. RMN-¹H compuesto 1d.

Figura A1.6. RMN-¹H compuesto 1e.

Figura A1.7. RMN-¹H compuesto 1f.

Figura A1.8. RMN-¹H compuesto **1g**.
Figura A1.9. RMN-¹H compuesto **1h**.
Figura A1.10. RMN-¹H compuesto **1i**.
Figura A1.11. RMN-¹H Timol (**2**).
Figura A1.12. RMN-¹H compuesto **2a**.
Figura A1.13. RMN-¹H compuesto **2b**.
Figura A1.14. RMN-¹H compuesto **2c**.
Figura A1.15. RMN-¹H compuesto **2d**.
Figura A1.16. RMN-¹H compuesto **2e**.
Figura A1.17. RMN-¹H compuesto **2f**.
Figura A1.18. RMN-¹H compuesto **2g**.
Figura A1.19. RMN-¹H compuesto **2h**.
Figura A1.20. RMN-¹H compuesto **2i**.
Figura A1.21. RMN-¹H Eugenol (**3**).
Figura A1.22. RMN-¹H compuesto **3a**.
Figura A1.23. RMN-¹H compuesto **3b**.
Figura A1.24. RMN-¹H compuesto **3c**.
Figura A1.25. RMN-¹H compuesto **3d**.
Figura A1.26. RMN-¹H compuesto **3e**.
Figura A1.27. RMN-¹H compuesto **3f**.
Figura A1.28. RMN-¹H compuesto **3g**.
Figura A1.29. RMN-¹H compuesto **3h**.
Figura A1.30. RMN-¹H compuesto **3i**.
Figura A2.2. FTIR compuesto **1a**.
Figura A2.3. FTIR compuesto **1b**.
Figura A2.4. FTIR compuesto **1c**.
Figura A2.5. FTIR compuesto **1d**.
Figura A2.6. FTIR compuesto **1e**.
Figura A2.7. FTIR compuesto **1f**.
Figura A2.8. FTIR compuesto **1g**.
Figura A2.9. FTIR compuesto **1h**.
Figura A2.10. FTIR compuesto **1i**.
Figura A2.11. FTIR Timol (**2**).
Figura A2.12. FTIR compuesto **2a**.

Figura A2.13. FTIR compuesto **2b**.
Figura A2.14. FTIR compuesto **2c**.
Figura A2.15. FTIR compuesto **2d**.
Figura A2.16. FTIR compuesto **2e**.
Figura A2.17. FTIR compuesto **2f**.
Figura A2.18. FTIR compuesto **2g**.
Figura A2.19. FTIR compuesto **2h**.
Figura A2.20. FTIR compuesto **2i**.
Figura A2.21. FTIR Eugenol (**3**).
Figura A2.22. FTIR compuesto **3a**.
Figura A2.23. FTIR compuesto **3b**.
Figura A2.24. FTIR compuesto **3c**.
Figura A2.25. FTIR compuesto **3d**.
Figura A2.26. FTIR compuesto **3e**.
Figura A2.27. FTIR compuesto **3f**.
Figura A2.28. FTIR compuesto **3g**.
Figura A2.29. FTIR compuesto **3h**.
Figura A2.30. FTIR compuesto **3i**.
Figura A3.1. HRMS Mentol (**1**).
Figura A3.1. HRMS compuesto **1a**.
Figura A3.3. HRMS compuesto **1b**.
Figura A3.4. HRMS compuesto **1c**.
Figura A3.5. HRMS compuesto **1d**.
Figura A3.6. HRMS compuesto **1e**.
Figura A3.7. HRMS compuesto **1f**.
Figura A3.8. HRMS compuesto **1g**.
Figura A3.9. HRMS compuesto **1h**.
Figura A3.10. HRMS compuesto **1i**.
Figura A3.11. HRMS Eugenol (**3**).
Figura A3.12. HRMS compuesto **3a**.
Figura A3.13. HRMS compuesto **3b**.
Figura A3.14. HRMS compuesto **3c**.
Figura A3.15. HRMS compuesto **3d**.
Figura A3.16. HRMS compuesto **3e**.

Figura A3.17. HRMS compuesto **3f**.

Figura A3.18. HRMS compuesto **3g**.

Figura A3.19. HRMS compuesto **3h**.

Figura A3.20. HRMS compuesto **3i**.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de los nuevos derivados de Mentol, Timol y Eugenol.

Tabla 2. Descriptores moleculares calculados para Mentol, Timol, Eugenol y sus derivados.

Tabla 3. SMILES de los compuestos analizados.

Tabla 4. Tiempos de retención (t_r) en GC del Mentol y sus derivados.

Tabla 5. Tiempos de retención (t_r) en HPLC del Timol y sus derivados.

Tabla 6. Tiempos de retención (t_r) en HPLC del Eugenol y sus derivados.

Tabla 7. Cifras de significancia estadística para las curvas de calibrado de Mentol (1), Timol (2) y Eugenol (3).

Tabla 8. Porcentaje de recuperación del Mentol, Timol y Eugenol.

Tabla 9. Estabilidad química de **1e** en soluciones acuosas a diferentes valores de pH's.

Tabla 10. Resultados del servidor PerMM para la permeabilidad pasiva de los compuestos.

Tabla 11. Datos de velocidad (Vel) y permeabilidad aparente (P_{app}).

Tabla 12. Composición del Lipoid 75.

Tabla 13. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Mentol y sus prodrogas.

Tabla 14. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Timol y sus prodrogas.

Tabla 15. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Eugenol y sus prodrogas.

Tabla 16. Porcentaje de identidad de secuencia.

Tabla 17. Porcentaje de identidad de estructura.

Tabla 18. Valores RMSD para la superposición de los sustratos cristalizados y acoplados.

Tabla 19. Energía de unión (en kcal/mol) de las conformaciones acopladas más favorables según la puntuación de AutoDockVina.

Tabla 20. Valores del promedio de RMSD del backbone de la proteína y ligando.

Tabla 21. Perfil de energía de unión de los ligandos a TcDHODH, LbDHODH y PfdHODH basado en MM-PBSA.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABL: Capa límite acuosa

ACN: Acetonitrilo

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

ANB: Anfotericina B

BZN: Benznidazol

CCF: Cromatografía en Capa Fina

CDI: 1',1'-carbonildiimidazol

CE50: Concentración efectiva media

CG: Cromatografía Gaseosa

CL50: Concentración letal cincuenta

COSY: Espectroscopia de Correlación Homonuclear

CPRG: Clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido

CQ: Cloroquina

DHOH: Dihidrorotato deshidrogenasa

DM: Dinámica molecular

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DOX: Doxorrubicina

EC: *Enzyme Commission number*

EIDs: Enfermedades Infecciosas Desatendidas

ER: Enlaces rotatorios

FBS: Suero fetal bovino

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

FX: Fexinidazol

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

HMBC: Correlación de Enlaces Múltiples Heteronucleares

HRMS: Espectroscopia de Masas de Alta Resolución

HSQC: Correlación Cuántica Simple Heteronuclear

IFA: Ingrediente farmacéutico activo

IS: Índice de selectividad

LbDHOH: *Leishmania braziliensis* Dihidrorotato deshidrogenasa

LC: Leishmaniasis cutánea

LMC: Leishmaniasis mucocutánea

LV: Leishmaniasis visceral
MAB: Membrana artificial biomimética
MeOH: Metanol
MFI: Intensidad media de fluorescencia
MM-PBSA: Mecánica molecular superficie de Poisson-Boltzmann
n-AEH; Número aceptores de enlaces de hidrógeno
n-DEH; Número dadores de enlaces de hidrógeno
NX: Nifurtimox
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAMPA: Ensayo de permeabilidad de la membrana artificial en paralelo
PCA: Análisis de componentes principales
PfDHOH: *Plasmodium falciparum* Dihidrorotato deshidrogenasa
PKDL: Leishmaniasis dérmica post kala-azar
PM: Peso molecular
PMA: Forbol 12-miristato 13-acetato
RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN-¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMSD: Análisis de la raíz cuadrática media
RMSF: Fluctuación de la media cuadrática
TcDHOH: *Trypanosoma cruzi* Dihidrorotato deshidrogenasa
TPSA: Área de superficie polar topológica
UWL: Capa de agua no agitada

- Etapa del descubrimiento: consiste en la identificación de nuevos compuestos bioactivos, generalmente llamados cabezas de serie o líder. Estos pueden proceder tanto de la síntesis en Química Orgánica, como de fuentes naturales o de procesos biotecnológicos.

- Etapa de optimización: consiste en la modificación química del compuesto líder con el fin de aumentar su potencia, su selectividad, y/o disminuir su toxicidad, dando como resultado un compuesto candidato.

- Etapa de desarrollo: implica la optimización de procesos que permitan obtener el fármaco en escala industrial, además de mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacotécnicas para su uso terapéutico.

Las etapas principales de la obtención de un nuevo fármaco se resumen en la Figura 2.

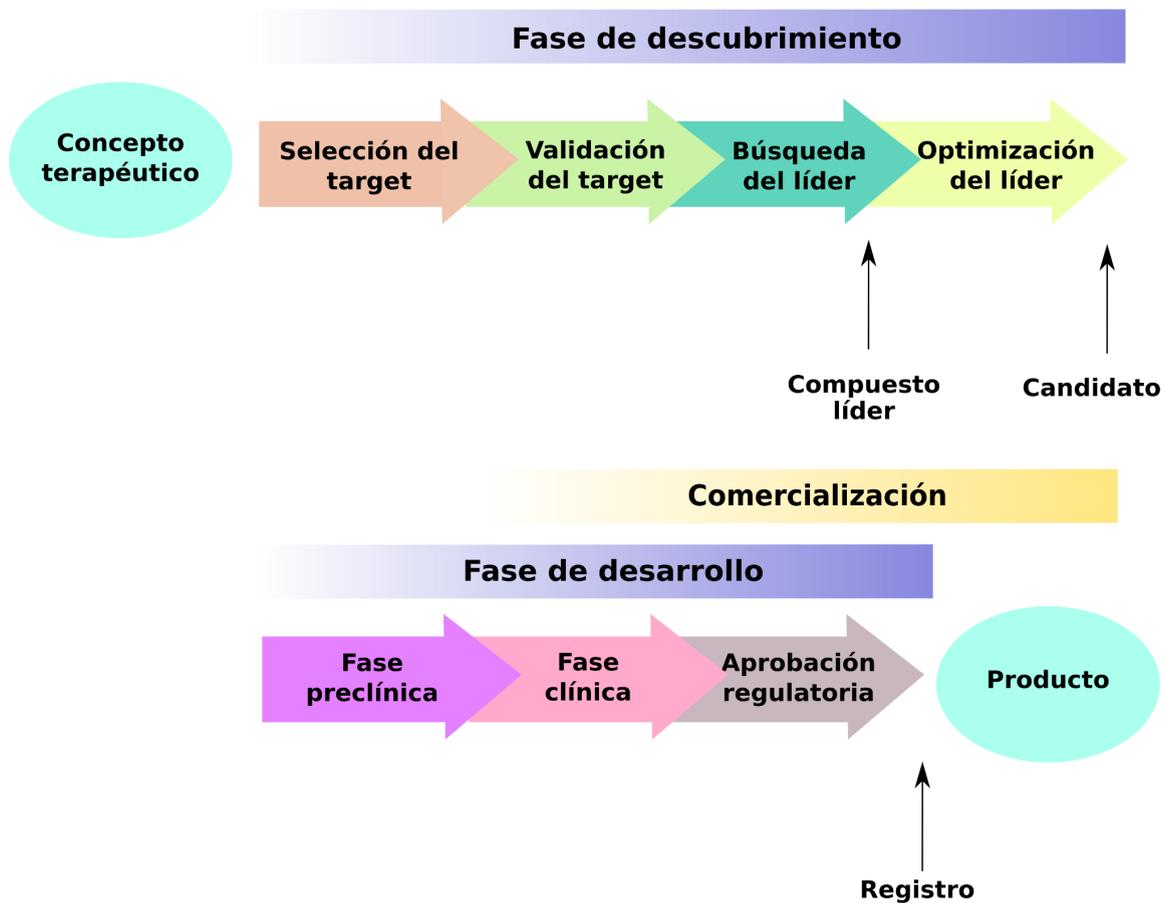


Figura 2. Proceso de investigación y desarrollo de un fármaco. Figura adaptada de la referencia Hill & Richards (2021) [5].

El proceso de investigación y desarrollo para llegar a la comercialización de un nuevo fármaco requiere de una gran inversión económica y de tiempo, alrededor de 10-15 años de trabajo [3,5].

La fase de descubrimiento consiste en la elección de una enfermedad y de un posible blanco terapéutico (receptor, enzima, grupo transportador, modelos celulares o modelos *in vivo*). Luego, se procede a la selección, identificación, aislamiento y caracterización de nuevas sustancias activas frente al blanco seleccionado. Tales sustancias se denominan líderes o cabezas de serie, las cuales se pueden obtener a partir de la síntesis orgánica, de fuentes naturales o mediante biotecnología.

Una vez descubierto el compuesto líder se continúa con la síntesis de análogos. Se realizan modificaciones químicas sobre la molécula con el objeto de mejorar la potencia y la selectividad y de disminuir toxicidad y efectos adversos. Además, estos análogos son sometidos a una evaluación sistemática de los parámetros farmacocinéticos tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) y de la biodisponibilidad oral. Estas nuevas estrategias incluyen estos estudios en etapas tempranas del desarrollo, para lograr descartar con anticipación candidatos no satisfactorios.

Finalmente, la selección de los mejores análogos conduce a los candidatos. En esta fase se realiza la optimización de la ruta de síntesis más favorable para la obtención del mejor compuesto diseñado en la etapa anterior, así como las condiciones ideales para su producción en grandes cantidades. Se modifican también las propiedades farmacocinéticas y farmacéuticas para su utilización en clínica. Durante este proceso se preparan nuevas formulaciones farmacéuticas tendientes a mejorar la absorción, la solubilidad en agua o prolongar el tiempo de duración del efecto.

Luego de obtener el candidato comienzan los estudios preclínicos y clínicos (Fase I, II y III), que conducen a su conversión en medicamento. Por último, se realiza el registro del producto frente a las autoridades regulatorias de salud y posteriormente, sobreviene la fase de comercialización siendo ya un producto terminado o medicamento.

Una vez que el fármaco está en el mercado, es necesario realizar un seguimiento de su uso (también llamados ensayos clínicos de Fase IV) y, a la brevedad, el fabricante debe brindar a los organismos competentes un informe sobre cualquier efecto secundario que no hubiese sido detectado previamente. Esta evaluación de seguimiento es importante, ya que los

estudios realizados en las fases anteriores a la comercialización del fármaco, incluso los más extensos, solo pueden detectar los efectos secundarios más frecuentes. A su vez, este seguimiento sirve para explorar y añadir nuevas indicaciones o mejorar las formulaciones existentes del fármaco [3,5].

1.1.1. Búsqueda de nuevos fármacos

Un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) se define como una sustancia con actividad farmacológica que será utilizada en un producto farmacéutico final [6]. El proceso de la búsqueda de un nuevo IFA inicia con la identificación de moléculas que muestran cierta actividad biológica deseada. Las vías de hallazgo de estas moléculas pueden ser muy diversas, desde la observación fortuita de los efectos biológicos, aislamiento de compuestos de origen natural, síntesis de compuestos estructuralmente similares a productos naturales con actividad biológica, cribado sistemático de familias químicas en determinados ensayos biológicos/bioquímicos, el diseño racional basado principalmente en estudios computacionales y finalmente el reposicionamiento de fármacos.

Una vez halladas aquellas moléculas con la actividad biológica deseada por alguna de las aproximaciones mencionadas, se selecciona el compuesto más promisorio (compuesto líder). Para esta selección, se tienen en cuenta los valores de actividad, toxicidad y propiedades fisicoquímicas que permitan proyectar buenos perfiles farmacológicos y farmacocinéticos. Sin embargo, a pesar de que el compuesto líder sea prometedor, en general es necesario introducir ciertas modificaciones que mejoren sus propiedades, conduciendo de esta forma al compuesto que tenga las condiciones para incluirse en las pruebas clínicas y eventualmente llegar a ser un compuesto comercial.

1.1.1.1. Prodrogas

Un fármaco ideal es aquel que es activo, factible de formular, con buena absorción por vía oral, con un perfil farmacocinético adecuado, que sea eliminado por riñón o transformado en metabolitos no tóxicos y excretado por orina. Sin embargo, no siempre se obtiene un fármaco que cumpla con todos estos requisitos.

Como se mencionó anteriormente, el descubrimiento y desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso largo, complejo e incierto desde que se inicia el proyecto hasta que eventualmente se logra la comercialización [7]. Una de las principales causas por las que un potencial fármaco

puede fracasar en su desarrollo como molécula con uso terapéutico, es que presente propiedades farmacocinéticas desfavorables en ADME [8, 9].

Con el objetivo de superar estas desventajas no deseadas que presentan algunas moléculas y que limitan su desarrollo hacia un fármaco con utilidad terapéutica, se pueden llevar a cabo variaciones en la formulación farmacéutica del fármaco, como así también la síntesis de análogos del compuesto o el desarrollo de prodrogas. Esta última estrategia, presenta la ventaja de modificar de forma temporal las propiedades del fármaco activo.

La acción de los fármacos está gobernada por las fases farmacéutica, farmacocinética y farmacodinámica, las cuales se encuentran interconectadas entre sí [10, 11]. La fase farmacéutica está enmarcada en el tipo de formulación que se administra al paciente, mientras que la fase farmacocinética está dada por los eventos de ADME, y la fase farmacodinámica por la interacción fármaco-receptor. El diseño de prodrogas obedece a un intento de optimizar las propiedades farmacocinéticas de un IFA, ya que modificando algunas de estas propiedades también se pueden producir cambios en la fase farmacéutica y/o en la farmacodinámica, confiriendo así una mayor complejidad al proceso de diseño de una prodroga.

Las prodrogas son compuestos inactivos como tales, que requieren de un proceso de bioactivación *in vivo*, regenerando el fármaco activo original. En este sentido, las prodrogas pueden considerarse como compuestos que contienen un complemento molecular transitorio, que no resulta tóxico y que optimiza o elimina propiedades desfavorables del fármaco.

Existen dos clases principales de prodrogas: a) prodrogas unidas a un complemento molecular y b) bioprecusores. Estos últimos, resultan de la modificación de la estructura molecular del fármaco y necesitan una activación metabólica en el organismo mediante un proceso inverso al de las reacciones metabólicas del tipo I (ej. oxidación, reducción, fosforilación) para regenerar el principio activo [12].

Por otra parte, en las prodrogas unidas a un complemento molecular, el fármaco se encuentra unido a una molécula química mediante un enlace covalente temporal. Los tipos de enlace más comúnmente utilizados para obtenerlas son el enlace éster, amida, carbamato, carbonato, éter, imina o fosfato (Figura 3). La escisión del complemento molecular regenera al fármaco activo y al menos un producto secundario.

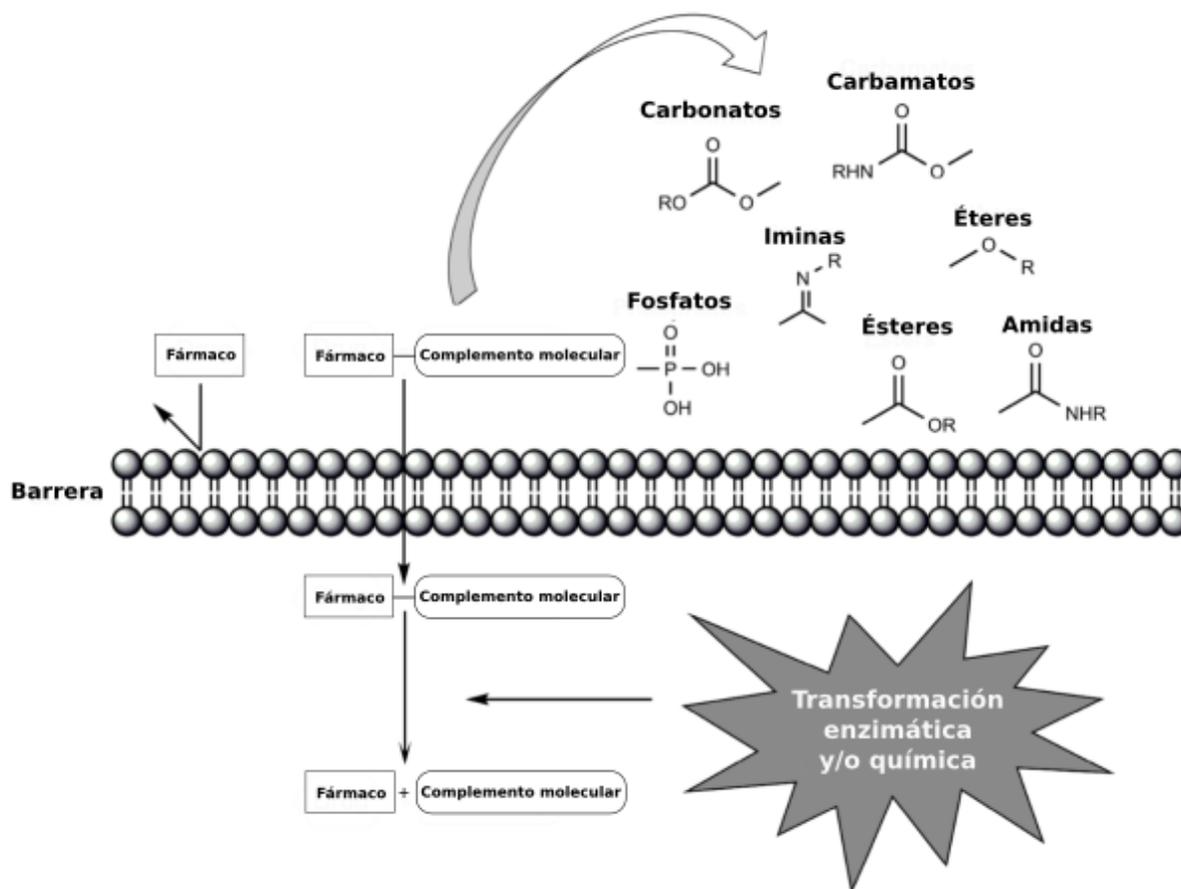


Figura 3. Bioactivación *in vivo* de prodrogas mediante transformaciones enzimáticas y/o químicas. Figura adaptada de la referencia Jornada y colaboradores (2015) [13].

Existen diferentes tipos de complementos moleculares: aminoácidos, alcoholes, aminas, polisacáridos, polímeros, entre otros. Estos complementos moleculares se utilizan para generar prodrogas que mejoren las propiedades desfavorables de los principios activos. La selección del complemento depende del propósito para el cual se diseña la prodroga, el tipo de grupos funcionales que es posible derivatizar en el principio activo, los mecanismos de conversión química y enzimática de la prodroga, la biocompatibilidad del complemento molecular y su disponibilidad en el mercado [13].

La unión entre el fármaco y el complemento molecular puede ser directa o a través de un grupo espaciador. A éste último tipo se los conoce como “prodrogas múltiples”, en las cuales el grupo espaciador puede modificar propiedades de lipofilicidad, velocidad de regeneración del principio activo, permeabilidad, etc. [14].

Las prodrogas comercializadas en la actualidad demuestran superar las limitaciones de solubilidad y permeabilidad, mejorar la capacidad de dirigir el fármaco al blanco molecular

de la enfermedad, superar del extenso metabolismo del fármaco y aumentar la seguridad del tratamiento. A raíz del alto desarrollo de nuevos métodos computacionales se espera lograr mejorar significativamente la eficiencia del proceso de desarrollo de las prodrogas, permitiendo que su influencia y desarrollo crezcan exponencialmente en el mercado [15].

1.1.1.2. Compuestos naturales

Los productos naturales y sus análogos estructurales han contribuido históricamente de forma importante a la farmacoterapia, de manera particular en el cáncer y las enfermedades infecciosas [16, 17].

Las entidades químicas con origen en fuentes naturales ofrecen características especiales en comparación con las moléculas sintéticas convencionales. Los productos naturales poseen una rica diversidad y complejidad estructural ofreciendo una distribución diversa de propiedades moleculares en comparación con las bibliotecas de compuestos sintéticos [18-20].

Además, se conoce que los productos naturales están estructuralmente optimizados por la evolución para servir a funciones biológicas concretas, entre ellas la regulación de los mecanismos de defensa endógenos y la interacción (a menudo competencia) con otros organismos, lo que explica su gran relevancia en las enfermedades infecciosas y el cáncer [16, 17]. Asimismo, su uso en la medicina tradicional a través del tiempo podría aportar información sobre su eficacia y seguridad [21].

A pesar de las ventajas mencionadas, varios inconvenientes han llevado a las compañías farmacéuticas a reducir los programas de descubrimiento de fármacos basados en productos naturales. Algunos de estos inconvenientes son: acceder a suficiente muestra biológica para aislar y caracterizar una entidad química bioactiva, compatibilidad de los productos naturales con los ensayos tradicionales de evaluación de actividad e inconvenientes en la obtención de derechos de propiedad intelectual, ya que los compuestos naturales en su forma original (no modificados) no siempre pueden patentarse [22].

Desde el punto de vista farmacéutico, las complicaciones que presentan están relacionados a su solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad y falta de selectividad limitando considerablemente la conversión de estos agentes terapéuticos en fármacos.

La baja solubilidad lleva a un mayor riesgo de falla durante el desarrollo de la formulación, ya que puede comprometer la evaluación de propiedades, enmascarar propiedades indeseables

adicionales, influir en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto y por consiguiente, puede reducir la eficacia de un candidato terapéutico prometedor [23].

La inestabilidad química, la cual hace referencia al proceso de degradación que sufre el principio activo desde que se ha disuelto, lleva a una disminución de su concentración y a menudo a cambios organolépticos, aparición de productos de degradación, que pueden llegar a ser tóxicos o perjudiciales, y pérdida de actividad. Diversos factores pueden provocar o favorecer la degradación, tales como, presencia de catalizadores de la reacción, pH, microorganismos, oxígeno, luz, humedad y temperatura [23].

Además, la limitada distribución a los sitios blanco y la baja biodisponibilidad son factores adicionales que obstaculizan el uso de estos compuestos en un entorno clínico [24, 25] y plantean una serie de desafíos que necesitan ser superados para su establecimiento como una farmacoterapia efectiva [25, 26].

Estas propiedades particulares de los compuestos de origen natural desalentaron su búsqueda por parte de la industria farmacéutica a partir de la década de 90'. En los últimos años, debido a diversos avances tecnológicos y científicos, como la mejora de las herramientas analíticas, las estrategias de extracción e ingeniería del genoma, están permitiendo abordar estos retos y generar nuevas oportunidades. En consecuencia, se está revitalizando el interés por los productos naturales como fuente de desarrollo de nuevos fármacos [22].

1.1.1.2.1. Mentol, Timol y Eugenol

Las plantas se han utilizado con fines terapéuticos durante siglos. Los aceites esenciales son líquidos volátiles, o semilíquidos, extraídos de las plantas, insolubles en agua y se oxidan fácilmente por exposición al aire, siendo mezclas complejas de hidrocarburos y alcoholes sesquiterpénicos y monoterpénicos, cetonas y aldehídos. La mayoría de las actividades biológicas de los aceites esenciales, en particular su actividad antimicrobiana, están asociadas a los terpenos oxigenados, como los alcoholes y los terpenos fenólicos [27]. El 90% de los compuestos que poseen los aceites esenciales son monoterpenos [28].

Los monoterpenos pertenecen a un grupo amplio y diverso de compuestos naturales. La estructura básica de los monoterpenos consiste en dos unidades de isopreno enlazadas, formadas por una base de 5 carbonos cada una [29]. Estos compuestos tienen una gran variedad de estructuras con diversas funciones como antimicrobiana, hipotensora,

antiinflamatoria, antipruriginosa, entre otras [30]. Los monoterpenos son económicos, y se han utilizado ampliamente en aromas y fragancias desde principios del siglo XIX. Recientemente, en la industria farmacéutica están desempeñando un gran papel debido a su potencial terapéutico [31]. Los monoterpenos también se incluyen en la categoría de los nutraceuticos, área que en la actualidad representa una industria en auge con interesantes inversiones económicas [30].

El Mentol, Timol y Eugenol son monoterpénicos fenólicos (Figura 4) que actualmente presentan un marcado interés para el desarrollo de nuevos fármacos. Específicamente, la selección de estas moléculas como candidatas para el desarrollo de esta Tesis Doctoral surge de un screening previo realizado en el grupo de investigación el cual se observó que tenían propiedades biológicas prometedoras en comparación a otros monoterpenos. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han documentado sus propiedades biológicas, tales como sus efectos analgésicos [32, 33] antibacterianos [34], antifúngicos [35], antivirales [36-38], antiparasitarios [39-41], antiinflamatorios [42-44], entre otros.

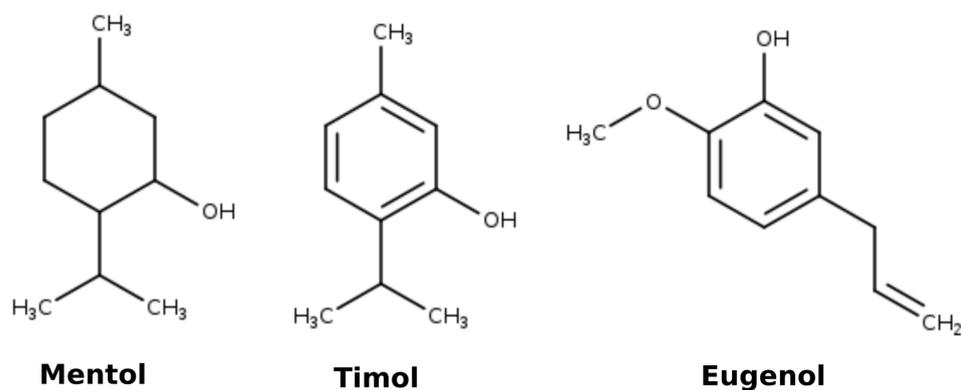


Figura 4. Estructuras químicas del Mentol, Timol y Eugenol.

Además de las propiedades que se mencionaron anteriormente, actualmente se están desarrollando diversas investigaciones que combinan estos monoterpenos con diversos fármacos.

Bkaitan y colaboradores, diseñaron y sintetizaron prodrogas de derivados de ésteres y éteres del fármaco Metronidazol con Mentol, Timol y Eugenol, con la estrategia de combinar la actividad antibacteriana del Metronidazol y la actividad antibacteriana y antioxidante ya reportada de estos monoterpenos. De los resultados de los ensayos biológicos realizados con dos cepas de *Helicobacter pylori* (ATCC 26695 y P12), y una cepa *Clostridium perfringens*

(ATCC 13124), hallaron diversas prodrogas prometedoras con mayor actividad antibacteriana que el compuesto de partida [45].

Redasani y colaboradores, siguiendo la misma línea de investigación, diseñaron y sintetizaron prodrogas de ésteres del Ibuprofeno con Mentol, Timol y Eugenol. La finalidad de esta estrategia fue mejorar la eficacia terapéutica del Ibuprofeno, retardando los efectos secundarios gastrointestinales mediante el enmascaramiento del grupo carboxílico y además potenciar la actividad antiinflamatoria. Observaron que las prodrogas sintetizadas mostraron una mayor actividad antiinflamatoria atribuida al efecto sinérgico del Ibuprofeno conjugado con estos analgésicos naturales. Además, demostraron una gran reducción de la ulceración gástrica en comparación con el Ibuprofeno [46]. Sehajpal y colaboradores, utilizaron la misma estrategia sintetizando prodrogas de derivados de ésteres de Ketoprofeno con los monoterpenos antes mencionados y obtuvieron el mismo resultado, concluyendo que estas prodrogas mantuvieron o mejoraron la actividad antiinflamatoria y analgésica con una reducción significativa del índice de úlcera [47].

En otras investigaciones la estrategia utilizada no se basó en la síntesis de nuevos derivados, sino en la administración del monoterpeno junto con fármacos antibacteriales hidrofílicos e hidrofóbicos contra bacterias Gram negativas. En dichos estudios encontraron una actividad sinergista entre el monoterpeno y ciertos antibióticos, atribuyendo la efectividad del monoterpeno a la posibilidad de causar daños en la membrana bacteriana [48].

Los diversos estudios que se reportaron se orientaron a potenciar la actividad biológica del fármaco que ya se comercializaba a través de la búsqueda de un sinergismo con compuestos naturales. Sin embargo, los monoterpenos a pesar de sus diversas actividades biológicas comprobadas, son inestables en las formulaciones debido a que tienen una alta volatilidad, lo que puede limitar su potencial eficiencia terapéutica. Recientemente, muchos estudios se han centrado en el desarrollo de formulaciones más estables para superar estos inconvenientes. Para mejorar su estabilidad, las estrategias más prometedoras han incluido la encapsulación, la emulsificación y las modificaciones químicas como la esterificación [49-52].

A raíz de lo mencionado, esta Tesis Doctoral propone aportar al conocimiento en cuanto a la búsqueda de nuevas prodrogas del Mentol, Timol y Eugenol a través de uniones carbonatos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria, enfermedades infecciosas de alta incidencia y prevalencia en Latinoamérica.

1.2. Enfermedades Infecciosas Desatendidas

La expresión Enfermedades Infecciosas Desatendidas (EIDs) se propuso por primera vez a principios de la década del 2000, debido a una iniciativa mundial de focalizar la atención de la salud pública en enfermedades específicas como VIH/SIDA, Tuberculosis y Malaria [53-59]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las EIDs como un grupo de infecciones bacterianas, parasitarias, víricas y fúngicas que prevalecen en muchos de los países tropicales y subtropicales en desarrollo, donde la pobreza es imperante y que afecta a más de mil millones de personas [60]. Por el contrario, las EIDs son bastante raras en los países más desarrollados del mundo [61] (Figura 5).

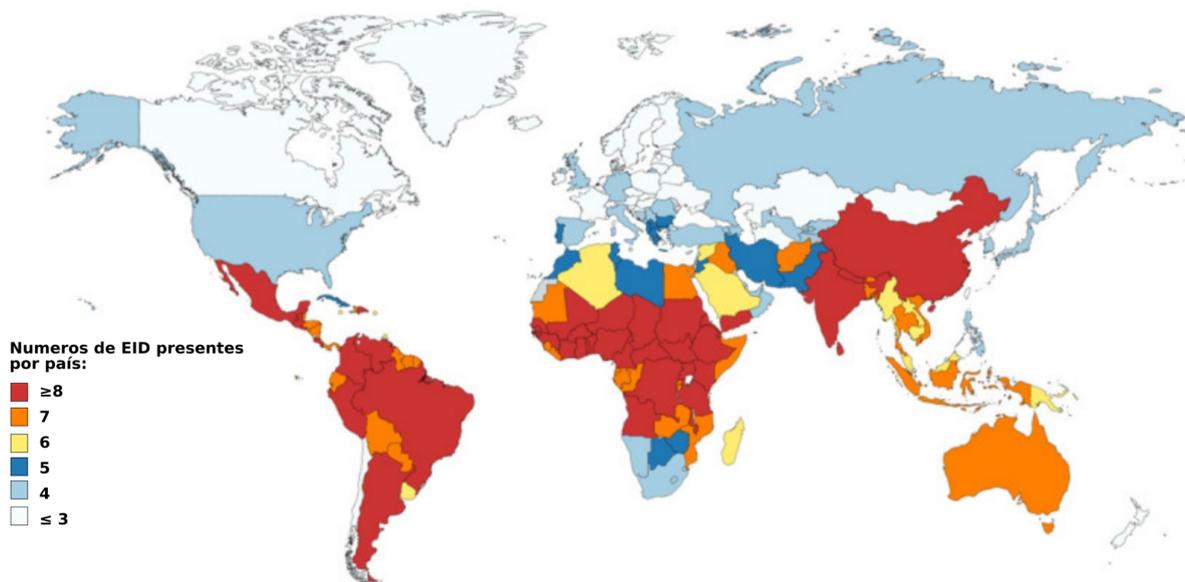


Figura 5. Número de EIDs presentes por país según las estimaciones de la OMS. Figura adaptada de la OMS [60].

Las enfermedades que engloban las EIDs se caracterizan por la escasez de políticas, inversión e investigación en herramientas de control y prevención. En cuanto al diseño y desarrollo de nuevos tratamientos para estas enfermedades, existe un desinterés por parte de las compañías farmacéuticas debido a que como se mencionó anteriormente las EIDs afectan mayoritariamente a poblaciones con limitados recursos económicos y esto genera un mercado no redituable y poco favorable para las compañías farmacéuticas.

Las EIDs imponen una gran carga social y económica en las personas y en las comunidades que las padecen, no sólo debido a las alta tasa de morbilidad y mortalidad, sino porque generan una pérdida de ingresos económicos debido a las secuelas y discapacidades que generan conduciendo a las familias afectadas a un modo de vida aún más difícil y de calidad limitada, que contribuye a perpetuar el ciclo de la pobreza [62]. La prevención, detección temprana, diagnóstico clínico, tratamientos adecuados y vigilancia permanente son necesidades que poseen las EIDs y que deben atenderse. Para ello, es necesario la contribución de diferentes organismos gubernamentales, no gubernamentales, laboratorios de investigación, compañías farmacéuticas, etc.

1.2.1. Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad se transmite mediante el insecto vector triatoma (también conocida como vinchuca), ésta se alimenta de sangre y libera los tripomastigotes en las heces cerca del sitio de picadura del insecto. Una vez en la sangre, los tripomastigotes invaden a las células, donde se diferencian en amastigotes. Esta forma intracelular se replica por fisión binaria. Luego, los amastigotes se empiezan a transformar en tripomastigotes y se liberan a la circulación sanguínea. Los tripomastigotes infectan una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección, las manifestaciones clínicas resultan de este ciclo infectante [63]. En la Figura 6 se encuentra un resumen del ciclo de vida del parásito *T. cruzi* en estadios humanos.

Las manifestaciones clínicas se clasifican en fase aguda y fase crónica. Luego de la transmisión de *T. cruzi* por el insecto vector, el período de incubación es de 1 a 2 semanas. En la fase aguda usualmente los síntomas son leves y no específicos y pueden incluir fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica [64]. También se puede producir una lesión inflamatoria en el sitio de inoculación, conocida como chagoma [65]. La gran mayoría de las infecciones agudas no son detectadas. En menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es severa y potencialmente mortal debido a meningoencefalitis o miocarditis. En la mayoría de los pacientes (90% de los individuos infectados) los síntomas de la fase aguda se resuelven espontáneamente, al cabo de 4 u 8 semanas. Estos individuos pasan a la fase indeterminada de la enfermedad, caracterizada por la falta de síntomas y la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* [64, 65].

La mayoría de los pacientes con infecciones crónicas permanecen en la fase indeterminada (asintomática) de por vida. Sin embargo, entre 10 y 30% de estos pacientes desarrollan una forma sintomática de la enfermedad [65]. Por lo general, los síntomas aparecen años o incluso décadas después de haber adquirido la infección. La consecuencia más frecuente de la infección crónica por *T. cruzi* son los problemas cardíacos, donde la destrucción progresiva de las fibras cardíacas y la fibrosis intensa predispone al paciente a la falla cardíaca y a arritmias ventriculares [66]. Las arritmias pueden causar mareos, síncope y muerte súbita, siendo esta última la principal causa de muerte en pacientes con miocardiopatía chagásica [65, 66]. La segunda consecuencia más común, de la infección crónica por *T. cruzi*, es la disfunción del tracto gastrointestinal [65]. La forma digestiva de la enfermedad de Chagas se observa casi exclusivamente en los países del sur de la cuenca amazónica (Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay y partes de Brasil). Es probable que esta distribución geográfica se deba a las diferencias en el genotipo predominante de *T. cruzi* [64-66].

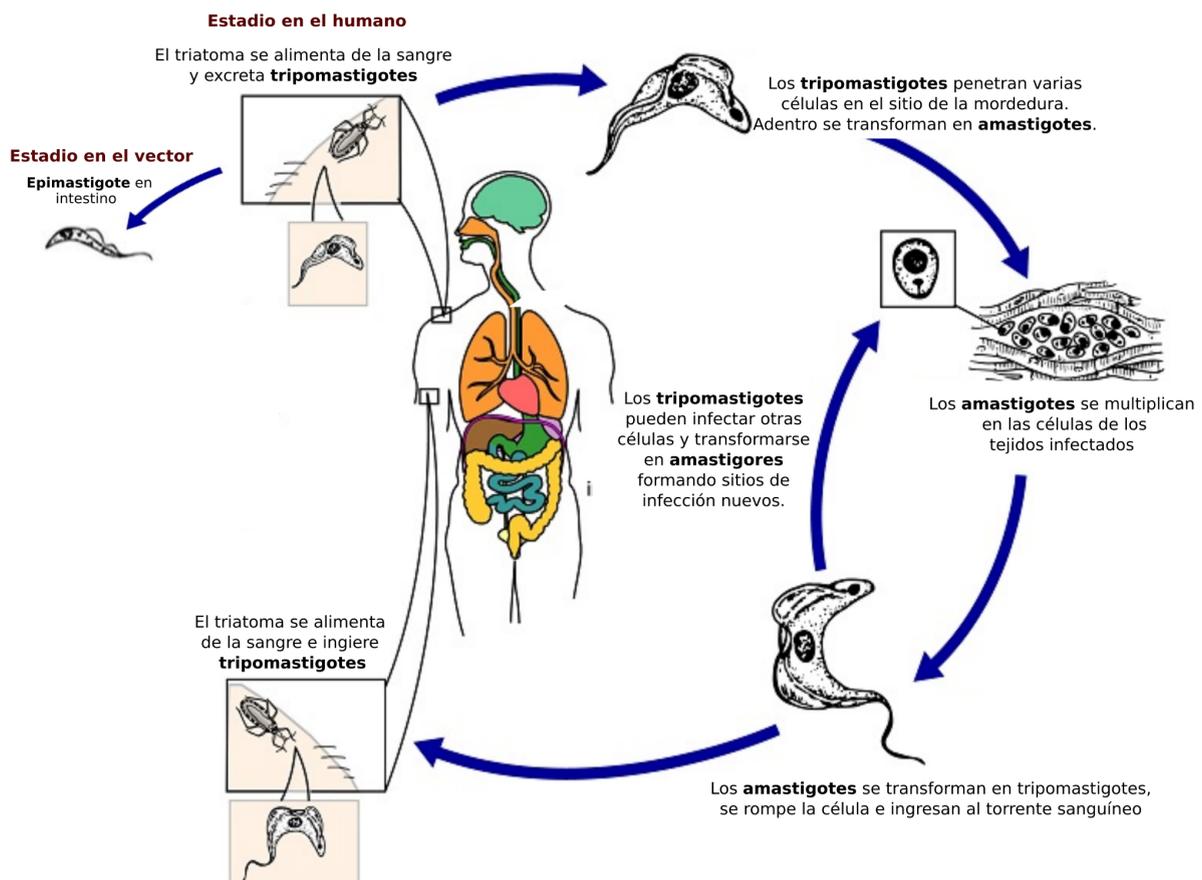


Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

Solo dos fármacos nitroheterocíclicos están disponibles para el tratamiento de la enfermedad, Nifurtimox y Benznidazol (BZN) (Figura 7A). Estos fármacos se desarrollaron hace más de 50 años y presentan graves inconvenientes, como efectos secundarios tóxicos, largos períodos de tratamiento y frecuentes fracasos terapéuticos [64].

Ambos fármacos son muy eficaces para curar la enfermedad si se administran inmediatamente después de la infección (inicio de la fase aguda). Sin embargo, requieren un tratamiento prolongado y su eficacia se reduce cuanto más tiempo lleva el paciente infectado, mostrando una baja eficacia en la fase crónica, así como otras limitaciones [67]. El BZN tiene el mejor perfil de seguridad, tolerancia y eficacia, y por lo tanto se utiliza a menudo como tratamiento de primera línea [68].

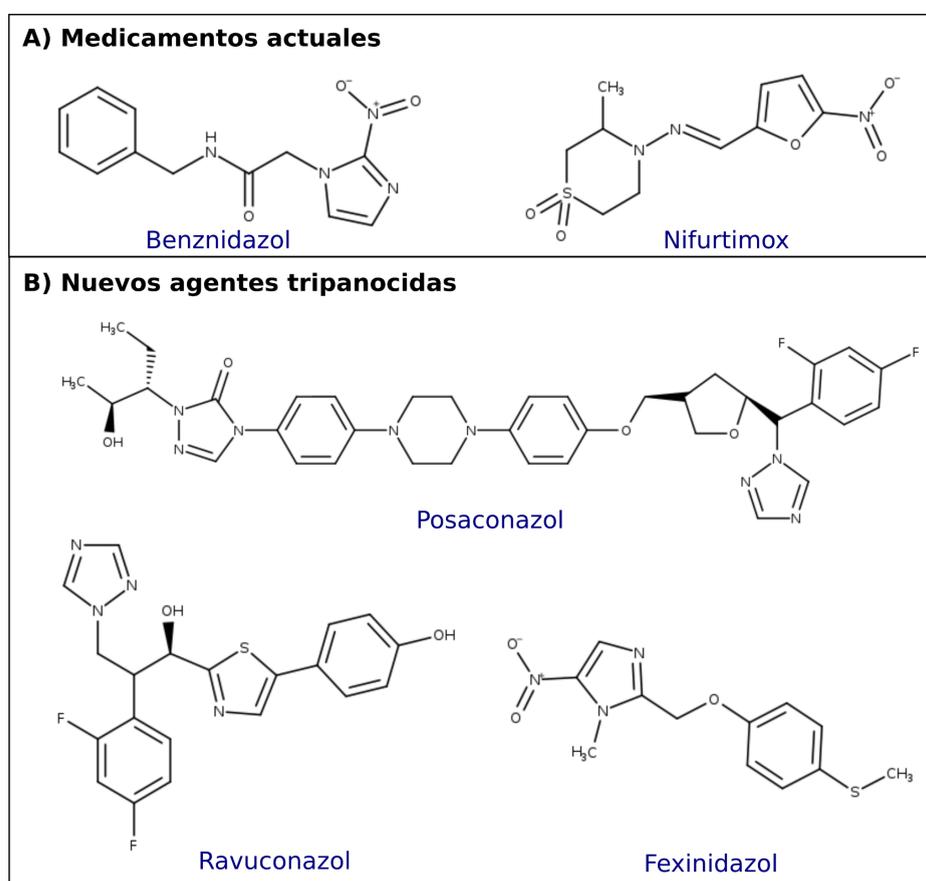


Figura 7. Estructuras de (A) medicamentos actuales y (B) potenciales agentes tripanocidas propuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Las recientes investigaciones en farmacoterapia para dicha enfermedad se centran en evaluar la eficacia de los dos fármacos actuales y los nuevos agentes tripanocidas (Posaconazol, Ravuconazol y Fexinidazol) en la etapa crónica de la enfermedad (Figura 7B). De los tres

nuevos tripanocidas mencionados, solo el Fexinidazol ha mostrado ser más eficaz que el BZN en la etapa crónica de la enfermedad [69].

1.2.2. Leishmaniasis

La Leishmaniasis constituye un grupo de enfermedades humanas y animales causadas por *Leishmania*, un parásito protozooario de la familia *Trypanosomatidae*. La Leishmaniasis es transmitida por la mordedura del díptero *Phlebotomus*, conocido como la mosca de los arenales.

Las moscas de los arenales inyectan los promastigotes cuando se alimentan de sangre. Los promastigotes, que alcanzan la herida abierta, son fagocitados por los macrófagos y se transforman en amastigotes. Los amastigotes se multiplican en las células infectadas y afectan a los diferentes tejidos, y dependiendo en parte de la especie de *Leishmania*, esta etapa origina las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Luego, las moscas de los arenales se infectan al alimentarse de la sangre del hospedador infectado, ingiriendo los macrófagos infectados con amastigotes [70]. En la Figura 8 se encuentra un resumen del ciclo de vida de *Leishmania* spp. en estadios humanos.

Las diversas manifestaciones clínicas de la Leishmaniasis dependen de la especie infectante y la respuesta del sistema inmune del huésped, afectando principalmente a niños y ancianos [71]. Un tipo de Leishmaniasis se conoce como Visceral (LV), en la cual se ven afectados órganos internos como bazo, hígado, órganos linfáticos y médula ósea. Los pacientes pueden presentar fiebre, anorexia, pérdida de peso, distensión abdominal y debilidad que progresa de semanas a meses. En la mayoría de los casos, es fatal [72].

Otra manifestación clínica es la Leishmaniasis Cutánea (LC) que puede producir lesiones de tipo ulcerosas con bordes elevados en áreas del cuerpo expuestas y accesibles a los flebótomos, como la cara, el cuello y las extremidades. La difusión de *Leishmania* proveniente de una infección cutánea puede conducir al desarrollo de Leishmaniasis mucocutánea, en donde meses a años más tarde se genera una desfiguración grave y destrucción de los tejidos de la cara y las mucosas [73].

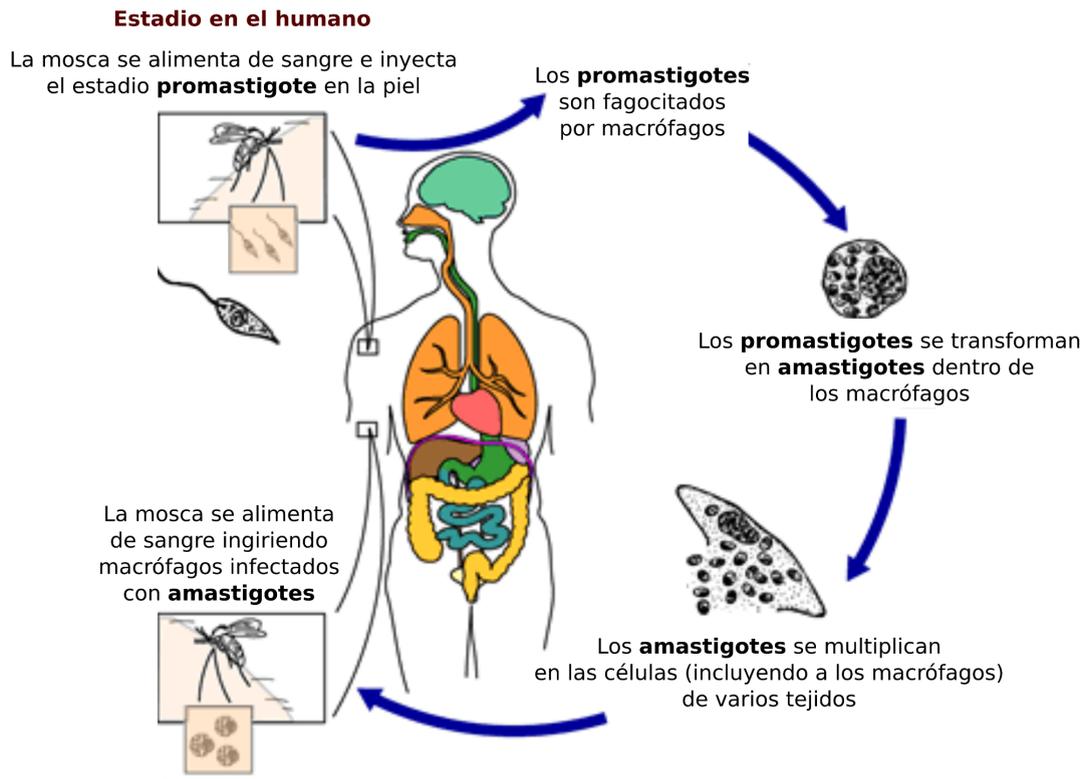


Figura 8. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

El tratamiento de primera línea de la Leishmaniasis son los compuestos antimoniales pentavalentes, dichos fármacos están disponibles desde hace casi siete décadas y las dos formulaciones principales son el Antimoniato de meglumina y el Estibogluconato de sodio. Como una alternativa, el fármaco AmBisome®, una formulación liposomal de Anfotericina B, es muy eficaz para LV, pero es un tratamiento costoso. Como resultado, AmBisome® es utilizada con frecuencia como tratamiento de segunda línea para pacientes en los que los fármacos antimoniales no son efectivos debido a la aparición de resistencia del parásito. En estos casos también ha sido de utilidad el uso de Paromomicina (principalmente en LC) y el fármaco Miltefosina, originalmente utilizado como anticancerígeno (Figura 9) [74].

En la actualidad, no se conocen nuevos fármacos prometedores para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, hay avances en nuevas estrategias en terapias físicas y locales, que incluyen termoterapia, crioterapia, administración de láser de CO y administración intralesional de fármacos. Estas nuevas estrategias han dado una mejor perspectiva de curación en los pacientes con LC. Otra alternativa que está en estudio es el uso de terapias combinadas, en las cuales se intenta activar el sistema inmunitario mediante

inmunomoduladores que buscan ayudar a resolver los problemas relacionados con la resistencia parasitaria y los casos graves de infección por VIH/*Leishmania* spp. Por último, se está investigando el uso de sistemas de administración de fármacos basados en la nanotecnología donde se permitiría realizar un tratamiento de la enfermedad con menos tiempo y costos, ya que utilizando la nanotecnología se promueve una administración eficaz de diferentes tipos de fármacos en tejidos y células específicos infectados por los parásitos de *Leishmania* spp. [74].

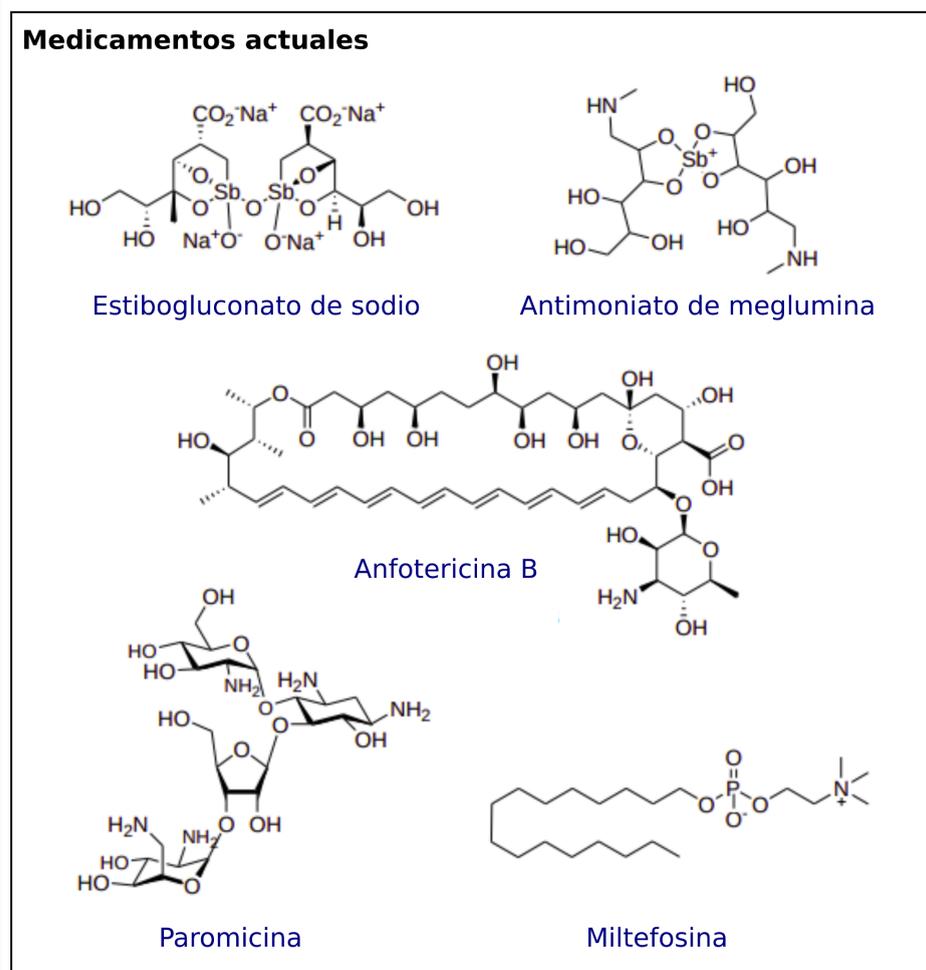


Figura 9. Estructuras de medicamentos actuales para el tratamiento de Leishmaniasis.

1.2.3. Malaria

Prácticamente todos los casos de Malaria en humanos son causados por cuatro especies de protozoos intracelulares del género *Plasmodium*. La infección es producida usualmente por la picadura del mosquito hembra de género *Anopheles* infectado por el parásito. Los

esporozoitos introducidos circulan rápidamente en el torrente sanguíneo hacia al hígado, donde invaden las células hepáticas (hepatocitos) y maduran a esquizontes.

En las especies *P. vivax* y *P. ovale* algunos esquizontes se vuelven latentes (hipnozoito), el hipnozoito pasado cierto tiempo se activa y se vuelve esquizonte en el tejido hepático. A través de la replicación asexual, los esquizontes en los hepatocitos liberan merozoitos que ingresan a la circulación sanguínea invadiendo los eritrocitos e iniciando el ciclo eritrocítico [75].

Cuando el merozoito entra en el eritrocito se forma un trofozoito. Los trofozoitos maduran en esquizontes generando una liberación de merozoitos. Estos estadios parasitarios sanguíneos son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Algunos parásitos eritrocíticos se diferencian en formas sexuales conocidas como gametocitos, que pueden infectar a un nuevo mosquito al ser absorbidos por el mismo durante una picadura [75]. En la Figura 10 se encuentra un resumen del ciclo de vida *Plasmodium* spp. en estadios humanos.

La manifestación clínica de los casos más graves, producida generalmente por la especie más agresiva, *P. falciparum*, suele incluir fiebre alta, escalofríos, diarrea, cefalea, y en pocas horas puede evolucionar a un cuadro severo con alteración hepática, renal, trastornos de la coagulación, edema pulmonar y cerebral, encefalopatía, coma y muerte. Incluso los casos leves pueden evolucionar rápidamente a una forma mortal, por lo que un diagnóstico y tratamiento precoz son esenciales. La letalidad sin tratamiento oscila entre el 10 y el 40%.

Las otras formas de paludismo humano por lo general no amenazan la vida de forma inmediata. En las infecciones por *P.vivax*, *P.ovale* y *P.malariae* el cuadro se presenta como fiebre recurrente y malestar general de varios días, con fuertes escalofríos y cefalea, que culmina con sudores profusos. Tras un lapso de tiempo sin fiebre se repite el ciclo con una cierta periodicidad según la especie infectante. Tras superar esta primoinfección pueden ocurrir recidivas, causadas por hipnozoitos (formas latentes de *P.vivax* o *P.ovale* en el tejido hepático) que se reactivan y con ello persisten las crisis de clínica palúdica durante años, incluso toda la vida. Estas recidivas no se dan en las formas producidas por *P. falciparum* y *P.malariae*, pero sí pueden existir recaídas en las 4 formas, que no se deben a hipnozoitos, sino a una elevación de la parasitemia, anteriormente limitada, por factores que de algún modo disminuyen la inmunidad del huésped [75].

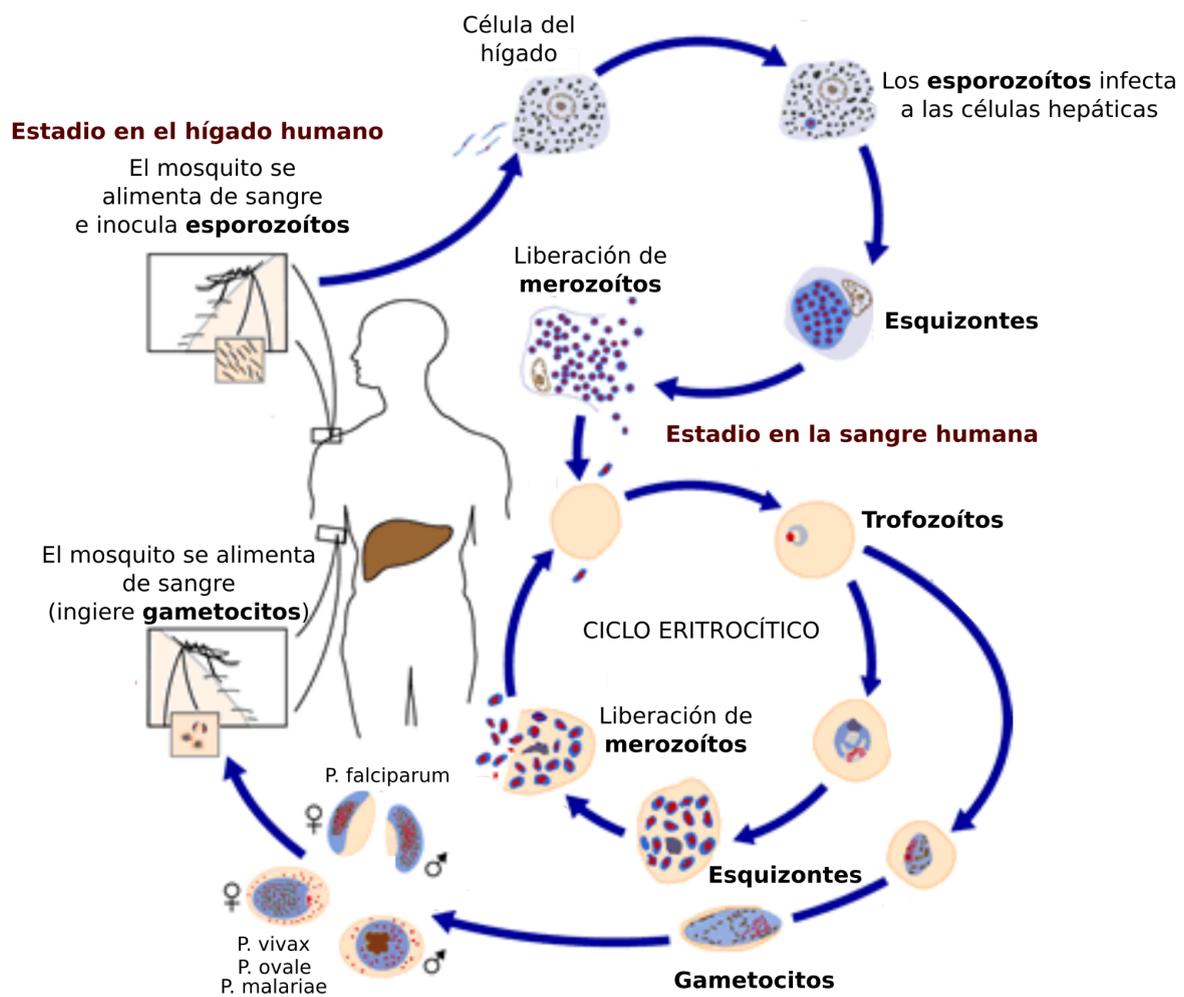


Figura 10. Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. en estadios humanos. Imagen adaptada de CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

En la Figura 11 se encuentran los tratamientos disponibles para la enfermedad. Debido a los avances en el conocimiento de la biología del parásito, así como la disponibilidad de su secuencia del genoma, en la actualidad se están investigando novedosos blancos moleculares para el desarrollo de nuevos compuestos activos [76-78]. Los nuevos compuestos activos que están demostrando ser efectivos son de origen natural o sintético y están siendo evaluados frente a cepas resistentes del parásito. Estos fundamentan su acción en varias vías/blanco de los plasmodios, tales como la vía de salvamento de las purinas y la biosíntesis de pirimidinas [79, 80].

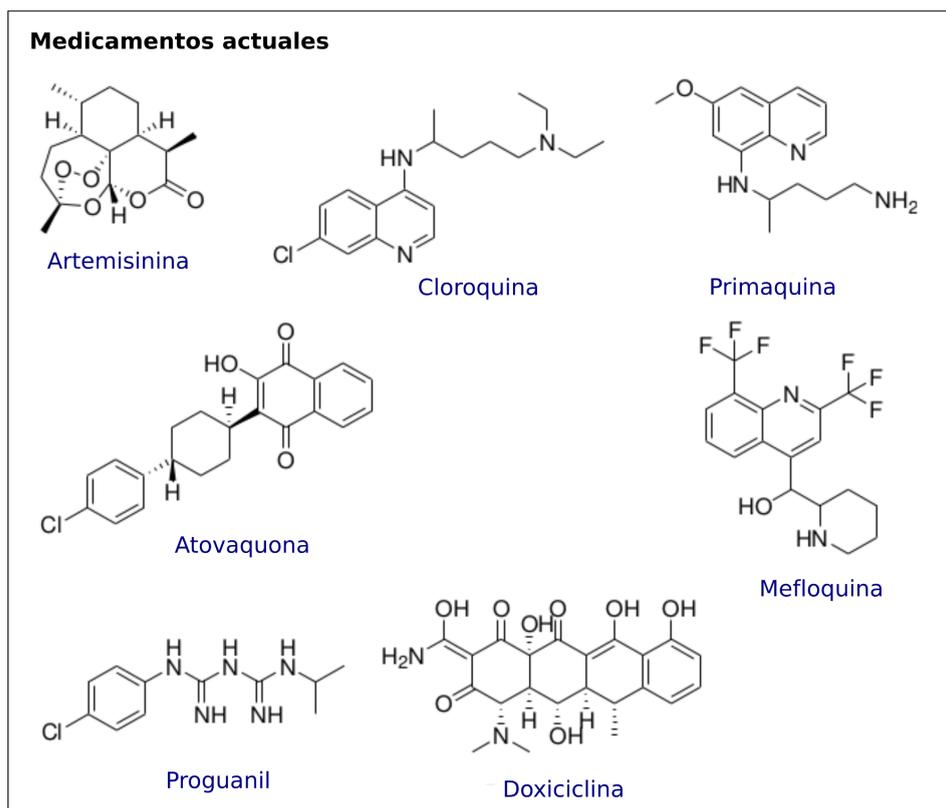


Figura 11. Estructuras de medicamentos actuales para el tratamiento de Malaria.

En cuanto al desarrollo de vacunas contra la Malaria, las mismas se pueden clasificar en tres grupos: vacunas para la fase preeritrocítica, vacunas para la fase sanguínea y vacunas para bloquear la transmisión. La vacuna RTS,S/AS01 está registrada bajo la denominación comercial Mosquirix® y es una vacuna dirigida a la fase preeritrocítica. Después de 30 años de investigación, es la primera y hasta la fecha la única vacuna, capaz de reducir la Malaria entre la población infantil. A pesar de que la investigación a lo largo de los años ha logrado avances significativos en el área de las vacunas contra la Malaria en humanos, todavía no se ha logrado desarrollar una vacuna contra la Malaria que sea ampliamente protectora y práctica [81,82].

1.3. Bibliografía

- [1] C. Wermuth, D. Aldous, P. Raboisson & D. Rognan, “Medicinal chemistry: Definitions and objectives, drug activity phases, drug classification systems in: The practice of medicinal chemistry”, *Academic Press*, 2015.
- [2] P. Raboisson, D. Rognan, D. Aldous & C. G. Wermuth, “The practice of medicinal chemistry”, *Elsevier*, 2015.

- [3] B. E. Blass, "Basic principles of drug discovery and development". *Academic Press*, 2021.
- [4] A. D. Cirilo, C. M. Llombart & J. J. Tamargo, "Introducción a la química terapéutica, Ediciones Diaz de Santos, 2003.
- [5] R. G. Hill & D. Richards, "Drug discovery and development e-book: Technology in transition", *Elsevier Health Sciences*, 2021.
- [6] F. Argentina, 7ma Edición. Comisión Permanente para la Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/pfds/Farmacopea_Argentina_2013_Ed, vol. 7.
- [7] J. G. Lombardino & J. A. Lowe, "The role of the medicinal chemist in drug discovery then and now", *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 10, pp. 853-862, 2004.
- [8] S. Ekins, Y. Nikolsky & T. Nikolskaya, "Techniques: Application of systems biology to absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity", *Trends in pharmacological sciences*, vol. 26, no. 4, pp. 202-209, 2005.
- [9] P. L. Nichols, "Automated and enabling technologies for medicinal chemistry", *Progress in Medicinal Chemistry*, vol. 60, pp. 191-272, 2021.
- [10] A. Madni, S. Noreen, A. Shafique, A. Rahim, M. Sarfraz & A. Afzal, "Role of prodrugs in drug design", *Recent advancement in prodrugs*, CRC Press, pp. 67-91, 2020.
- [11] S. C. Herranz & A. Díez-Torrubia, "Profármacos: Pasado, presente y futuro", *Anales de la real sociedad española de química*, pp. 207-214, 2010.
- [12] V. Abet, F. Filace, J. Recio, J. Alvarez-Builla & C. Burgos, "Prodrug approach: An overview of recent cases", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 127, pp. 810-827, 2017.
- [13] D. H. Jornada, G. F. dos Santos Fernandes, D. E. Chiba, T. R. F. De Melo, J. L. Dos Santos & M. C. Chung, "The prodrug approach: A successful tool for improving drug solubility", *Molecules*, vol. 21, no. 1, p. 42, 2016.
- [14] K. Shah, D. N. Chauhan, N. S. Chauhan & P. Mishra, "Recent advancement in prodrugs". *CRC Press*, 2020.

- [15] M. Markovic, S. Ben-Shabat & A. Dahan, “Prodrugs for improved drug delivery: Lessons learned from recently developed and marketed products”, *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 11, p. 1031, 2020.
- [16] A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, *et al.*, “Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review”, *Biotechnology advances*, vol. 33, no. 8, pp. 1582-1614, 2015.
- [17] A. L. Harvey, R. Edrada-Ebel & R. J. Quinn, “The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era”, *Nature reviews drug discovery*, vol. 14, no. 2, pp. 111-129, 2015.
- [18] E. C. Barnes, R. Kumar & R. A. Davis, “The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery”, *Natural product reports*, vol. 33, no. 3, pp. 372-381, 2016.
- [19] J. W.-H. Li & J. C. Vederas, “Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier?”, *Science*, vol. 325, no. 5937, pp. 161-165, 2009.
- [20] J. Clardy & C. Walsh, “Lessons from natural molecules”, *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 829-837, 2004.
- [21] A. Zhang, H. Sun & X. Wang, “Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases”, *European journal of medicinal chemistry*, vol. 63, pp. 570-577, 2013.
- [22] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch & C. T. Supuran, “Natural products in drug discovery: Advances and opportunities”, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 20, no. 3, pp. 200-216, 2021.
- [23] M. Coimbra, B. Isacchi, L. Van Bloois, J. S. Torano, A. Ket, X. Wu, *et al.*, “Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes”, *International journal of pharmaceutics*, vol. 416, no 2, pp. 433-442, 2011.
- [24] K. Kesarwani, & R. Gupta, “Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview”, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, vol. 3, no 4, pp. 253-266, 2013.

- [25] Y. Shoji & H. Nakashima, "Nutraceuticals and delivery systems", *Journal of drug targeting*, vol. 12, no 6, pp. 385-391, 2004.
- [26] S. Nobili, D. Lippi, E. Witort, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini & S. Capaccioli, "Natural compounds for cancer treatment and prevention", *Pharmacological research*, vol. 59, no 6, pp. 365-378, 2019.
- [27] S. Castillo, C. O. Pérez-Alfonso, D. Martínez-Romero, F. Guillén, M. Serrano & D. Valero, "The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage", *Food Control*, vol. 35, no 1, pp. 132-136, 2014.
- [28] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck & M. Idaomar, "Biological effects of essential oils: a review", *Food and chemical toxicology*, vol. 46, no. 2, pp. 446-475, 2008.
- [29] M. Zielińska-Błajet & J. Feder-Kubis, "Monoterpenes and their derivatives: recent development in biological and medical applications", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 19, p. 7078, 2020.
- [30] A. G. Guimarães, J. S. Quintans & L. J. Quintans-Júnior, "Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review", *Phytotherapy research*, vol. 27, no. 1, pp. 1-15, 2013.
- [31] Y. Ghasemi, A. Mohagheghzadeh, M. Moshavash, Z. Ostovan, S. Rasoul-Amini, M. H. Morowvat, M. B. Ghoshoon, M. J. Raei & S. B. Mosavi-Azam, "Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, no. 7, pp. 1301-1304, 2009.
- [32] S. S. Ghori, M. Ahmed, M. Arifuddin & M. Khateeb, "Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of formulation containing camphor, menthol and thymol", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 8, pp. 271-274, 2016.
- [33] S.H. Park, Y.B. Sim, J.K. Lee, S.M. Kim, Y.J. Kang, J.S. Jung & H.W. Suh, "The analgesic effects and mechanisms of orally administered Eugenol", *Archives of Pharmacal Research*, vol. 34, no. 3, pp. 501-507, 2011.
- [34] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, A. Gouch, B. Lyoussi & A. Abdellaoui, "Antibacterial efficacy of thymol, carvacrol, Eugenol and menthol as alternative agents to

control the growth of nosocomial infection-bacteria”, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 11, no. 2, pp. 306-309, 2019.

[35] S. Abbaszadeh, A. Sharifzadeh, H. Shokri, A. Khosravi & A. Abbaszadeh, “Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, Eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi”, *Journal de mycologie medicale*, vol. 24, no. 2, pp. e51-e56, 2014.

[36] D. J. Taylor, S. M. Hamid, A. M. Andres, H. Saadaeijahromi, H. Piplani, J. F. Germano, Y. Song, S. Sawaged, R. Feuer, S. J. Pandol, *et al.*, “Antiviral effects of menthol on coxsackievirus b”, *Viruses*, vol. 12, no. 4, p. 373-374, 2020.

[37] F. Benencia & M. Courreges, “In vitro and in vivo activity of Eugenol on human herpesvirus”, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 14, no. 7, pp. 495-500, 2000.

[38] J. Sharifi-Rad, B. Salehi, N. Baghalpour, F. Kobarfard, M. Sharifi-Rad & M. Mohammadizade, “Antiviral activity of monoterpenes thymol, carvacrol and p-cymene against herpes simplex virus in vitro”, *International Pharmacy Acta*, vol. 1, no. 1, p. 73, 2018.

[39] J. Fabbri, C. M. Clemente, N. Elissondo, G. Gambino, S. Ravetti, L. Y. Hergert, S. D. Palma, and M. C. Elissondo, “Anti-echinococcal activity of menthol and a novel prodrug, menthol-pentanol, against echinococcus multilocularis”, *Acta tropica*, vol. 205, p. 105411, 2020.

[40] C. M. Clemente, S. Ravetti, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, T. Pineda & S. M. Robledo, “Synthesis, *in vitro* antiprotozoal activity and cytotoxicity of new thymol carbonate derivatives”, *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 25, pp. 6597-6600, 2021.

[41] S. M. de Moraes, N. S. Vila-Nova, C. M. L. Bevilaqua, F. C. Rondon, C. H. Lobo, A. d. A. A. N. Moura, A. D. Sales, A. P. R. Rodrigues, J. R. de Figueiredo, C. C. Campello, *et al.*, “Thymol and Eugenol derivatives as potential antileishmanial agents”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 22, no. 21, pp. 6250-6255, 2014.

[42] M. G. Zaia, T. d. O. Cagnazzo, K. A. Feitosa, E. G. Soares, L. H. Faccioli, S. M. Allegretti, A. Afonso & F. d. F. Anibal, “Anti-inflammatory properties of menthol and

menthone in schistosoma mansoni infection”, *Frontiers in pharmacology*, vol. 7, p. 170, 2016.

[43] A. N. Daniel, S. M. Sartoretto, G. Schmidt, S. M. Caparroz-Assef, C. A. Bersani-Amado & R. K. N. Cuman, “Anti-inflammatory and antinociceptive activities a of Eugenol essential oil in experimental animal models”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, pp. 212-217, 2009.

[44] P. C. Braga, M. Dal Sasso, M. Culici, T. Bianchi, L. Bordoni & L. Marabini, “Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase”, *Pharmacology*, vol. 77, no. 3, pp. 130-136, 2006.

[45] M. M. Bkhaitan, M. Alarjah, A. Z. Mirza, A. N. Abdalla, H. M. El-Said & H. S. Faidah, “Preparation and biological evaluation of metronidazole derivatives with monoterpenes and Eugenol”, *Chemical biology & drug design*, vol. 92, no. 6, pp. 1954-1962, 2018.

[46] V. K. Redasani & S. B. Bari, “Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of ibuprofen with menthol, thymol and Eugenol”, *European journal of medicinal chemistry*, vol. 56, pp. 134-138, 2012.

[47] S. Sehajpal, D. N. Prasad & R. K. Singh, “Novel ketoprofen-antioxidants mutual codrugs as safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, kinetic and pharmacological evaluation”, *Archiv der Pharmazie*, vol. 352, no. 7, p. 1800339, 2019.

[48] S. Hemaiswarya & M. Doble, “Synergistic interaction of Eugenol with antibiotics against gram negative bacteria”, *Phytomedicine*, vol. 16, no. 11, pp. 997-1005, 2009.

[49] F. Firenzuoli, V. Jaitak, G. Horvath, I. H. N. Bassolé, W. N. Setzer & L. Gori, “Essential oils: New perspectives in human health and wellness”, *Hindawi*, 2014.

[50] J. Rao, B. Chen & D. J. McClements, “Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action”, *Annual review of food science and technology*, vol. 10, pp. 365-387, 2019.

[51] S. Tharamak, T. Yooboon, A. Pengsook, A. Ratwatthananon, N. Kumrungsee, V. Bullangpoti & W. Pluempanupat, “Synthesis of thymyl esters and their insecticidal activity against *spodoptera litura* (lepidoptera: Noctuidae)”, *Pest management science*, vol. 76, no. 3, pp. 928-935, 2020.

- [52] A. Dominguez-Uscanga, D. F. Aycart, K. Li, W. H. Witola & J. E. A. Laborde, “Anti-protozoal activity of thymol and a thymol ester against *cryptosporidium parvum* in cell culture”, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 15, pp. 126-133, 2021.
- [53] D. H. Molyneux, P. J. Hotez & A. Fenwick, “‘Rapid-impact interventions’: How a policy of integrated control for africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor”, *PLoS medicine*, vol. 2, no. 11, p. e336, 2005.
- [54] P. J. Hotez, D. H. Molyneux, A. Fenwick, E. Ottesen, S. Ehrlich Sachs & J. D. Sachs, “Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for hiv/aids, tuberculosis, and malaria: A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world”, *PLoS medicine*, vol. 3, no. 5, p. e102, 2006.
- [55] P. Hotez, E. Ottesen, A. Fenwick & D. Molyneux, “The neglected tropical diseases: The ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination”, *Hot topics in infection and immunity in children III*, pp. 23-33, 2006.
- [56] P. J. Hotez, D. H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. E. Sachs, J. D. Sachs & L. Savioli, “Control of neglected tropical diseases”, *New England Journal of medicine*, vol. 357, no. 10, pp. 1018-1027, 2007.
- [57] P. J. Hotez, “Mass drug administration and integrated control for the world’s high-prevalence neglected tropical diseases”, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 85, no. 6, pp. 659-664, 2009.
- [58] P. J. Hotez, N. Mistry, J. Rubinstein & J. D. Sachs, “Integrating neglected tropical diseases into aids, tuberculosis, and malaria control”, *New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 22, pp. 2086-2089, 2011.
- [59] J. P. Webster, D. H. Molyneux, P. J. Hotez & A. Fenwick, “The contribution of mass drug administration to global health: Past, present and future”, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 369, no. 1645, p. 20130434, 2014.
- [60] Organización Mundial de la Salud. O. E. I. Desatendidas “https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/”,

- [61] L. M. Burgos, J. Farina, M. C. Liendro, C. Saldarriaga, A. S. Liprandi, F. Wyss, I. Mendoza, A. Baranchuk, *et al.*, “Neglected tropical diseases and other infectious diseases affecting the heart. The net-heart project: Rationale and design”, *Global heart*, vol. 15, no. 1, 2020.
- [62] OPS, “Enfermedades infecciosas desatendidas en las américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados”, *OPS Washington DC*, 2016.
- [63] J. A. Pérez-Molina & I. Molina, “Chagas disease”, *The Lancet*, vol. 391, no. 10115, pp. 82-94, 2018.
- [64] C. Bern, “Chagas disease”, *New England Journal of Medicine*, vol. 373, no. 5, pp. 456-466, 2015.
- [65] L. V. Kirchhoff, “American trypanosomiasis (chagas disease)”, *Principles and practice of clinical parasitology*, pp. 335-353, 2001
- [66] A. Rassi Jr, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, “Chagas disease”, *The Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388-1402, 2010.
- [67] A. H. Fairlamb, N. A. Gow, K. R. Matthews & A. P. Waters, “Drug resistance in eukaryotic microorganisms”, *Nature microbiology*, vol. 1, no. 7, pp. 1-15, 2016.
- [68] A. Haberland, S. G. M. Saravia, G. Wallukat, R. Ziebig & I. Schimke, “Chronic chagas disease: From basics to laboratory medicine”, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, no. 2, pp. 271-294, 2013.
- [69] J. Martín-Escolano, E. Medina-Carmona & R. Martín-Escolano, “Chagas disease: Current view of an ancient and global chemotherapy challenge”, *ACS Infectious Diseases*, vol. 6, no. 11, pp. 2830-2843, 2020.
- [70] S. Adak & R. Datta, “Leishmania: Current biology and control”, *Caister Academic Press*, 2015.
- [71] A. Hailu, D. A. Dagne & M. Boelaert, “Leishmaniasis”, *Neglected tropical diseases-sub-saharan africa*, Springer, pp. 87-112, 2016.
- [72] D. Pace., “Leishmaniasis”, *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10-S18, 2014.

- [73] I. P. Hernandez, J. Montanari, W. Valdivieso, M. J. Morilla, E. L. Romero & P. Escobar, “In vitro phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against new world leishmania species”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 117, pp. 157-163, 2012.
- [74] B. M. Roatt, J. M. de Oliveira Cardoso, R. C. F. De Brito, W. Coura-Vital, R. D. de Oliveira Aguiar-Soares & A. B. Reis, “Recent advances and new strategies on Leishmaniasis treatment”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1-13, 2020.
- [75] L. L. Brunton, B. A. Chabner, and B. C. Knollmann, “Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica”, *McGraw hill*, 2019.
- [76] R. Capela, R. Moreira & F. Lopes, “An overview of drug resistance in protozoal diseases”, *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no. 22, p. 5748, 2019.
- [77] A. C. Aguiar, L. R. de Sousa, C. R. Garcia, G. Oliva & R. V. Guido, “New molecular targets and strategies for antimalarial discovery”, *Current medicinal chemistry*, vol. 26, no. 23, pp. 4380-4402, 2019.
- [78] V. K. Vyas, S. Bhati, S. Patel & M. Ghate, “Structure-and ligand-based drug design methods for the modeling of antimalarial agents: A review of updates from 2012 onwards”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, pp. 1-26, 2021.
- [79] M. A. Avery, S.-R. Choi & P. Mukherjee, “The fight against drug-resistant malaria: Novel plasmodial targets and antimalarial drugs”, *Current medicinal chemistry*, vol. 15, no. 2, pp. 161-171, 2008.
- [80] M. A. Shibeshi, Z. D. Kifle & S. A. Atnafie, “Antimalarial drug resistance and novel targets for antimalarial drug discovery”, *Infection and Drug Resistance*, vol. 13, p. 4047, 2020.
- [81] A. M. Ahmad, “The gain in antimalarial vaccine”, *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*, pp. 48-51, 2020.
- [82] C. Marques-da-Silva, K. Peissig & S. P. Kurup, “Pre-erythrocytic vaccines against malaria”, *Vaccines*, vol. 8, no. 3, p. 400, 2020.

CAPÍTULO II

Objetivos y lineamientos generales

Teniendo en cuenta la problemática actual de las EIDs y la baja disponibilidad de fármacos efectivos y seguros para los tratamientos de los mismos, se planteó como Objetivo General de este trabajo de Tesis Doctoral, el diseño y desarrollo de prodrogas de Mentol, Timol y Eugenol obtenidos por combinación con alcoholes, en vistas al desarrollo de nuevas entidades químicas activas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria.

Sobre la base de lo expuesto, se plantean los Objetivos Específicos, los cuáles se pueden organizar según las etapas previstas para el desarrollo de esta Tesis:

- Diseñar nuevos derivados del Mentol, Timol y Eugenol, aplicar filtros del tipo “*drug-likeness*” y evaluar la similitud estructural (Capítulo III).
- Obtención de las nuevas series de prodrogas del Mentol, Timol y Eugenol a través de una metodología de síntesis sencilla que conlleve a buenos rendimientos y elucidación estructural completa utilizando técnicas espectroscópicas ampliamente aceptadas (Capítulo IV).
- Estudiar la estabilidad química de los nuevos compuestos en soluciones acuosas (Capítulo V).
- Evaluar la permeabilidad del Mentol, Timol, Eugenol y de sus prodrogas a través de un modelo *in silico* e *in vitro* (Capítulo VI).
- Evaluar la citotoxicidad y la actividad tripanocida, leishmanicida y antiplasmódica *in vitro* de los compuestos de partida y las prodrogas (Capítulo VII).
- Predecir si las proteínas dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) de *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), *Leishmania braziliensis* (LbDHODH) y de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) podrían ser un potencial blanco molecular para Mentol, Timol y Eugenol a través de estudios *in silico* (Capítulo VIII).

CAPÍTULO III

Diseño de nuevos derivados de Mentol, Timol y Eugenol

2.1. Consideraciones generales

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y sus componentes se han estudiado ampliamente contra numerosas bacterias, virus, hongos, parásitos e insectos [1-3].

Como se mencionó en el Capítulo I, la selección de los monoterpenos Mentol, Timol y Eugenol surge de un screening previo realizado en el grupo de investigación en el cual se observó que tenían propiedades biológicas prometedoras en comparación a otros monoterpenos. Diversas actividades biológicas de los monoterpenos fenólicos Mentol, Timol y Eugenol han sido reportadas; sin embargo, poco se conoce acerca de su actividad antiparasitaria [4-14].

Estos compuestos generalmente son reconocidos como seguros, tienen la ventaja de estar disponible en muchas fuentes naturales y tiene una toxicidad relativamente baja para las células de los mamíferos. Por lo tanto, el Mentol, Timol y Eugenol son compuestos que pueden considerarse como moléculas de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos contra los parásitos [15].

Debido a que uno de los objetivos planteados en este trabajo de Tesis es diseñar nuevas entidades químicas novedosas para tratar las EIDs a partir de los compuestos naturales Mentol, Timol y Eugenol, se decidió en primer lugar indagar los mecanismo de acción por el cual estos compuestos actúan.

A pesar de que la actividad antiparasitaria en los monoterpenos fenólicos no se encuentran totalmente caracterizados en la literatura, se halló que la actividad antimicrobiana ha sido la más estudiada reportando sus posibles mecanismos de acción. Sus efectos sobre la estructura y la función de las membranas se han utilizado generalmente para explicar su acción antimicrobiana. Debido a su lipofilicidad, estos se separan preferentemente de una fase acuosa en las estructuras de la membrana. Esto permite la expansión de la membrana, el aumento de la fluidez y la permeabilidad de la membrana, la alteración de las proteínas incorporadas a la membrana, la inhibición de la respiración y la alteración de los procesos de

transporte de iones [16].

Atki *et al.* reportaron que el grupo hidroxilo libre de estos compuestos desempeña un papel importante en sus actividades antimicrobianas, ya que es el responsable de lograr alterar la membrana externa de la célula y combinarse con los grupos cargados de la membrana, aumentando su permeabilidad [5]. Gill *et al.* reportaron que los monoterpenos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la ATPasa, lo que provoca la disipación de la fuerza motriz del protón, logrando regular posteriormente otras enzimas [17]. Así mismo, Boye *et al.* le atribuyeron al grupo hidroxilo del núcleo monoterpénico el efecto antibacteriano y sentaron bases para la exploración de posibles modificaciones químicas en el grupo hidroxilo [18].

A pesar de la potencia en cuanto a las actividades biológicas que poseen los monoterpenos, estos compuestos tienen baja estabilidad en las formulaciones, mostrando una alta volatilidad e inestabilidad química. Recientemente, diversos estudios se han centrado en desarrollar formulaciones más estables para superar estas desventajas. Para mejorar su estabilidad, las estrategias más prometedoras han sido la encapsulación [3], emulsión [19] y modificaciones químicas como la esterificación [20].

Como se describió en el Capítulo I, una de las estrategias utilizadas para optimizar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos es la generación de prodrogas. Las mismas, son moléculas farmacológicamente inactivas, que en el organismo regeneran el principio activo, a través de procesos de biotransformación.

De esta manera, sobre la base de las propiedades del Mentol, Timol y Eugenol y el concepto de prodroga nos hemos planteado, como objetivo de este Capítulo, el diseño de nuevas prodrogas de estos compuestos con propiedades fisicoquímicas mejoradas.

2.1.2. Quimioinformática

La quimioinformática se ha establecido como una disciplina importante en el descubrimiento de fármacos. La misma abarca diversos campos científicos de la química y la informática con el objetivo de tomar mejores decisiones con mayor rapidez en las áreas de identificación y optimización de fármacos [21]. La quimioinformática ha desempeñado un papel fundamental en la caracterización de moléculas provenientes de productos naturales, debido a que éstas cubren un espacio químico mucho más amplio que los compuestos sintéticos y pueblan también zonas del espacio químico que, por lo general, no son accesibles sintéticamente (o lo son con grandes dificultades) [22].

El cribado virtual, el diseño de bibliotecas y el cribado de alto rendimiento se han convertido

en métodos de elección en la industria cuando se manejan grandes cantidades de compuestos o datos [23]. En lo que respecta a la Química Computacional, la introducción de las cadenas de texto SMILES (del inglés, *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*), que describen la estructura molecular de forma compacta utilizando cadenas ASCII cortas, ha simplificado el manejo de los datos y permite una multitud de aplicaciones quimioinformáticas.

2.1.1.1. Filtros “*drug-likeness*”

Los productos naturales y sus derivados son una fuente importante para el desarrollo de nuevas entidades químicas contra las enfermedades parasitarias [24]. El éxito de una molécula durante el desarrollo de fármacos, por lo general, depende de que posea estructura y propiedades fisicoquímicas similares a fármacos ya conocidos (“*drug-likeness*”). Frecuentemente, la actividad de cualquier compuesto depende de su capacidad de permear la membrana celular para alcanzar a un determinado blanco molecular. Entonces, si analizamos las propiedades fisicoquímicas de una molécula, es posible predecir su permeabilidad celular y su biodisponibilidad.

Lipinski y sus colaboradores seleccionaron 2245 moléculas que llegaron a la fase II de los ensayos clínicos del *World Drug Index* y evaluaron sus propiedades fisicoquímicas, como el peso molecular (PM), el LogP (el logaritmo del coeficiente de partición entre el agua y el 1-octanol), el número de aceptores de enlaces de hidrógeno (n-AEH, como el número de N, O) y el número de dadores de enlaces de hidrógeno (n-DEH, como el número de -NH, -OH), con el fin de comprender qué factores son los responsables del abandono de una determinada molécula en el desarrollo clínico. Tras su investigación, basada en un conjunto simple de propiedades fisicoquímicas calculadas, se dió a conocer la "regla de los cinco" como resultado de su investigación (la misma posee números de cinco o múltiplos de 5) [25].

La regla de Lipinski o la regla de los cinco establece que es más probable que una molécula pequeña tenga una biodisponibilidad alta por vía oral si su PM es ≤ 500 ; su lipofilia, expresada como log P, es ≤ 5 ; el n-AEH es ≤ 5 y n-DEH es ≤ 10 [26]. Si un compuesto cumple al menos tres de los cuatro parámetros son denominados como compuestos “*drug-likeness*”, teniendo una alta probabilidad de tener una absorción intestinal y por consiguiente de convertirse en un buen fármaco para la vía de administración oral [27].

Sin embargo, se ha encontrado que los márgenes de Lipinski son demasiados estrictos y normalmente se aplican valores de corte algo superiores, principalmente en lo referente al

peso molecular y a la lipofilia [28].

Es por ello que Veber *et al.* expanden la regla de Lipinski, estableciendo que una buena biodisponibilidad oral es más probable para compuestos con ≤ 10 enlaces rotatorios (ER), y un área de superficie polar topológica (TPSA; del inglés, *Topological Polar Surface Area*) $\leq 140 \text{ \AA}^2$. Un valor de TPSA bajo se correlaciona mejor con el incremento en la permeabilidad de lo que lo hace la lipofilia (logP), y el incremento en los enlaces rotables genera un efecto negativo en la permeación [29].

A pesar de que las reglas no pueden garantizar que una molécula que cumpla todos los criterios sea susceptible de convertirse en un fármaco exitoso, proporciona una guía para que los químicos medicinales puedan realizar una mejor selección y diseño de las moléculas, con el fin de reducir tiempo y costos durante el desarrollo clínico debido a una farmacocinética insatisfactoria [30].

2.1.1.2. Análisis del espacio químico

La visualización del espacio químico desempeña un papel esencial en la quimioinformática, ya que se considera que las moléculas con actividad similar residen cerca unas de otras en el espacio químico [31-33]. Teniendo en cuenta esto, los métodos basados en la similitud desempeñan un papel sustancial en el descubrimiento de fármacos.

En un artículo publicado en Nature 2004, Lipinski y Hopkins compararon el espacio químico con el universo cosmológico: “El espacio químico puede considerarse análogo al universo cosmológico en su inmensidad, con los compuestos químicos poblando el espacio en lugar de las estrellas” [30]. Dobson, en su visión, define el espacio químico como “el espacio total de descriptores que abarca todas las pequeñas moléculas basadas en el carbono, que en principio, podrían crearse” [34]. Medina-Franco describió en su revisión en el simposio Horizon, titulado “Charting chemical space: finding new tools to explore biology”, al espacio químico como “el conjunto de todas las estructuras moleculares posibles” [35].

La analogía del espacio químico con el universo fue bien aceptada por la comunidad científica, ya que describe muy bien el reto que supone para el descubrimiento de fármacos encontrar compuestos biológicamente activos en el espacio químico. Ese reto consiste en identificar las regiones que probablemente contengan compuestos biológicamente activos, pudiendo definir así un espacio químico biológicamente relevante.

Está ampliamente aceptado que el espacio químico es enorme y que en realidad sólo se conoce una pequeña fracción de moléculas. Una fracción aún más pequeña de compuestos es

relevante para los fines de la química medicinal. Por ejemplo, Geysen *et al.* mencionan que el número de moléculas pequeñas relevantes podría estar entre 1014 y 1030 [36]. Bohacek *et al.* estimaron el número de compuestos con un número máximo de 30 átomos de C, N, O y S en 1060 moléculas [33]. Por supuesto, esta estimación aumentará cuando se consideren estructuras más grandes y complejas. Ertl sugiere que el espacio de la Química Orgánica contiene entre 1020 y 1024 moléculas sintéticamente viables utilizando los métodos de síntesis actualmente conocidos [37].

En resumen, durante años la noción subjetiva pero fundamental del espacio químico ha ayudado a los proyectos de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, en los últimos años, ha habido una gran expansión del espacio químico en cuanto al número de compuestos que se conocen o pueden sintetizarse [38]. Actualmente, gracias a las numerosas bases de datos químicos, la posibilidad de la predicción de descriptores fisicoquímicos, los avances en machine learning y diferentes desarrollos de software en la quimioinformática, donde están completamente validados y debidamente documentados, están permitiendo acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos [38].

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Diseñar nuevos derivados del Mentol, Timol y Eugenol, aplicar filtros del tipo “*drug-likeness*” y evaluar la similitud molecular.

2.2.2. Objetivos específicos

- Diseñar prodrogas del Mentol, Timol y Eugenol por asociación con diferentes alcoholes alifáticos a través de una unión carbonato.
- Predecir propiedades fisicoquímicas a través de herramientas quimioinformáticas y definir si las moléculas diseñadas poseen características del tipo “*drug-likeness*”.
- Predecir la similitud molecular y la diversidad química a través de herramientas quimioinformáticas.

2.3. Resultados

2.3.1. Diseño de prodrogas del Mentol, Timol y Eugenol

Para concretar nuestros objetivos, se han analizado los siguientes aspectos que deben

considerarse al plantear la formación de una prodroga:

- Factibilidad: conocer si existen en la molécula del prototipo (Mentol, Timol y Eugenol) grupos funcionales susceptibles de modificación química biorreversible.
- Posibilidad: estudiar si existen métodos químicos para efectuar selectivamente la modificación seleccionada.
- Economía: establecer si los intermediarios y reactivos necesarios son accesibles a un costo razonable.
- Posible estabilidad de los nuevos productos obtenidos.
- Toxicidad de la porción modificadora introducida.
- Posibilidades de regeneración *in vivo* de la molécula original.

Respondiendo al análisis anterior, se arribaron a las siguientes conclusiones con relación a la posible obtención de prodrogas de Mentol, Timol y Eugenol:

- El Mentol, Timol y Eugenol presentan un grupo funcional susceptible de modificación química biorreversible; el grupo hidroxilo en la posición C-1 (Figura 4). Nuestro interés está enfocado a la sustitución de la posición del hidroxilo, ya que éste es el grupo que se desea proteger en el diseño de estas nuevas prodrogas.
- Luego de analizar diferentes metodologías para poder obtener las prodrogas esperadas, concluimos que contamos con diferentes vías posibles para dicho objetivo.
- Tanto los intermediarios como los reactivos de interés nos fueron accesibles a un costo y tiempo razonable.
- Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro grupo de trabajo en donde se sintetizaron prodrogas con alcoholes alifáticos mediante uniones carbonatos [39-41], se planificó el diseño de los derivados de Mentol, Timol y Eugenol con la misma metodología, con la finalidad de reproducir propiedades farmacocinéticas óptimas.
- El complemento molecular seleccionado para cada prodroga posee una toxicidad baja y/o aceptable ya reportado en bibliografía.
- La regeneración *in vivo* de la molécula original es posible debido a que el grupo carbonato es susceptible de ser hidrolizado químicamente y por enzimas presentes en el organismo.

De esta manera, se diseñó una serie de carbonatos por reacción del grupo hidroxilo del C-1 del Mentol, Timol y Eugenol con los siguientes alcoholes alifáticos: metanol, etanol,

1-propanol, isopropanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-octanol. Los nuevos derivados diseñados se muestran en la Tabla 1. Se espera que esta nueva serie de derivados mejore considerablemente la capacidad para penetrar membranas lipídicas por difusión pasiva, por un aumento de la lipofilidad de los carbonatos propuestos.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, estos nuevos carbonatos actuarían como prodrugs (Capítulo V), siendo el complemento molecular, el alcohol alifático utilizado en cada síntesis en particular, y el Mentol, Timol y Eugenol, los únicos responsables de la actividad antiparasitaria.

Tabla 1. Estructura de los nuevos derivados de Mentol, Timol y Eugenol.

R	Compuestos		
H	Mentol (1)	Timol (2)	Eugenol (3)
C(O)OCH ₃	Mentol-Metanol (1a)	Timol-Metanol (2a)	Eugenol-Metanol (3a)
C(O)OCH ₂ CH ₃	Mentol-Etanol (1b)	Timol-Etanol (2b)	Eugenol-Etanol (3b)
C(O)O(CH ₂) ₂ CH ₃	Mentol-Propanol (1c)	Timol-Propanol (2c)	Eugenol-Propanol (3c)
C(O)OCH(CH ₃) ₂	Mentol-Isopropanol (1d)	Timol-Isopropanol (2d)	Eugenol-Isopropanol (3d)
C(O)O(CH ₂) ₃ CH ₃	Mentol-Butanol (1e)	Timol-Butanol (2e)	Eugenol-Butanol (3e)
C(O)O(CH ₂) ₄ CH ₃	Mentol-Pentanol (1f)	Timol-Pentanol (2f)	Eugenol-Pentanol (3f)
C(O)O(CH ₂) ₅ CH ₃	Mentol-Hexanol (1g)	Timol-Hexanol (2g)	Eugenol-Hexanol (3g)
C(O)O(CH ₂) ₆ CH ₃	Mentol-Heptanol (1h)	Timol-Heptanol (2h)	Eugenol-Heptanol (3h)
C(O)O(CH ₂) ₇ CH ₃	Mentol-Octanol (1i)	Timol-Octanol (2i)	Eugenol-Octanol (1i)

2.3.2. Filtros “*drug-likeness*”

En la Tabla 2 se encuentran las propiedades fisicoquímicas individuales (PM, cLogP, n-AEH, n-DEH, ER y TPSA) calculadas para los compuestos de partida y todos los derivados diseñados. En rojo se señalan los parámetros que violan la regla de Lipinski o Veber.

Tabla 2. Descriptores moleculares calculados para Mentol, Timol, Eugenol y sus derivados.

Compuesto	PM (g/mol)	cLogP	n-AEH	n-DEH	Lipinski	ER	TPSA (Å ²)
Mentol (1)	156,27	3,33	1	1	Cumple	1	20,23
1a	214,31	3,80	3	0	Cumple	4	35,54
1b	228,33	4,18	3	0	Cumple	5	35,54
1c	242,36	4,68	3	0	Cumple	6	35,54
1d	242,36	4,54	3	0	Cumple	5	35,54
1e	256,39	5,24	3	0	Cumple	7	35,54
1f	270,41	5,74	3	0	Cumple	8	35,54
1g	284,44	6,25	3	0	Cumple	9	35,54
1h	298,47	6,75	3	0	Cumple	10	35,54
1i	312,49	7,26	3	0	Cumple	11	35,54
Timol (2)	150,22	3,34	1	1	Cumple	1	20,23
2a	208,26	3,26	3	0	Cumple	4	35,54
2b	222,28	3,63	3	0	Cumple	5	35,54
2c	236,31	4,14	3	0	Cumple	6	35,54
2d	236,31	4,00	3	0	Cumple	5	35,54
2e	250,34	4,70	3	0	Cumple	7	35,54
2f	264,37	5,20	3	0	Cumple	8	35,54
2g	278,39	5,71	3	0	Cumple	9	35,54
2h	292,42	6,21	3	0	Cumple	10	35,54

2i	306,45	6,72	3	0	Cumple	11	35,54
Eugenol (3)	164,2	2,10	2	1	Cumple	3	29,46
3a	222,24	2,26	4	0	Cumple	6	44,77
3b	236,27	2,63	4	0	Cumple	7	44,77
3c	250,29	3,14	4	0	Cumple	8	44,77
3d	250,29	3,00	4	0	Cumple	7	44,77
3e	264,32	3,69	4	0	Cumple	9	44,77
3f	278,35	4,20	4	0	Cumple	10	44,77
3g	292,38	4,71	4	0	Cumple	11	44,77
3h	306,40	5,21	4	0	Cumple	12	44,77
3i	320,43	5,72	4	0	Cumple	13	44,77

PM: Peso molecular (g/mol).

cLogP: Coeficiente de partición octanol/agua

n-AEH: Número de aceptores de enlaces de hidrógeno.

n-DEH: Número de dadores de enlaces de hidrógeno.

ER: Enlaces rotables.

TPSA (del inglés, *Topological Polar Surface Area*): Área de superficie polar topológica (\AA^2).

Del análisis realizado observamos que todos los compuestos cumplen la regla de Lipinski, ya que ninguno de los compuestos violaron más de un parámetro [26]. En la serie del Mentol identificamos que los derivados **1e-i** violaron el parámetro cLogP que hace referencia a la lipofilidad. En la serie del Timol reconocemos el mismo efecto en los derivados **2f-i** y en la serie del Eugenol en los derivados **3h** y **3i**. Destacamos que los compuestos que violaron el criterio de cLogP corresponden a los derivados que poseen la cadena alifática más larga de la serie.

Con respecto a los criterios que establecen Veber *et al.*, los compuestos **1i**, **2i**, **3g**, **3h** y **3i** no cumplen los criterios de poseer 10 o menos enlaces rotables [29].

Debido a que ningún compuesto violó más de dos criterios de la regla de Lipinski [26], predecimos que todos los compuestos diseñados poseen una biodisponibilidad oral adecuada.

Sin embargo, por lo establecido por Veber, los compuestos mencionados anteriormente que no cumple el criterios de enlaces rotables podrían presentar dificultades en la permeación de membrana.

2.3.3. Análisis del espacio químico

A diferencia de los parámetros de Lipinski, que se centran en un conjunto restringido de propiedades similares a las de los fármacos donde son generadas directamente a partir de las estructuras moleculares, ChemGPS (sistema de posicionamiento global químico) es una herramienta que puede descubrir propiedades fisicoquímicas no discernibles directamente a partir de los datos estructurales, puede trazar un espacio químico biológicamente relevante y proporcionar un dispositivo de mapeo eficiente para la predicción de propiedades y actividades de grupos de compuestos [42].

Las coordenadas del mapa del espacio de los compuestos se extraen mediante un análisis de componentes principales (PCA). El PCA es un método matemático ampliamente utilizado en el descubrimiento de fármacos para transformar un espacio de descriptores multidimensional en un espacio de baja dimensión más manejable [43].

Las variables posiblemente correlacionadas de un conjunto de datos se comprimen en un número menor de variables no correlacionadas linealmente, llamadas componentes principales. Con esta herramienta es posible predecir la puntuación PCA para proyectar nuevas moléculas en el mapa y para explorar el espacio químico que ocupan estos compuestos en particular. La comparación con el conjunto de referencia se describe numéricamente como distancia euclidiana.

Diversos investigadores reportaron que los productos naturales tienden más a menudo a quedar fuera del espacio químico definido por el sistema ChemGPS [43]. Por ello, luego Larsson y sus colaboradores establecieron que ChemGPS, como tal, no es adecuado para los productos naturales, y el sistema de ChemGPS se amplió a ChemGPS-NP, donde NP (del inglés, *Natural products*) hace referencia a la inclusión de los productos naturales al sistema [42-44].

Con el fin de realizar el análisis de los componentes principales de los compuestos utilizamos el ChemGPS-NP para compuestos naturales y para los fármacos actualmente comercializados en las enfermedades de Chagas, Malaria y Leishmaniasis (mencionados en el Capítulo I). Los tres componentes principales se representan en las Figuras 12-15. El CP1 representa el tamaño, la forma y la polarizabilidad, el CP2 expresa las propiedades aromáticas y de

conjugación, y el CP3 describe la lipofilia, la polaridad y la capacidad de establecer enlace puente de hidrógeno [42].

En la Figura 12 se puede observar, que tanto los compuestos de partida como los derivados diseñados son principalmente moléculas de bajo tamaño (descritas por CP1). Los derivados de Timol y Eugenol, a diferencia de los derivados del Mentol, contienen una proporción importante de compuestos aromáticos (descritos por CP2). En cuanto a la polaridad, observamos que todos los derivados diseñados muestran una gama más amplia de polaridades, siendo moléculas más lipofílicas (situadas en la dirección positiva de CP3), que los compuestos de partida (situadas en la dirección negativa de CP3).

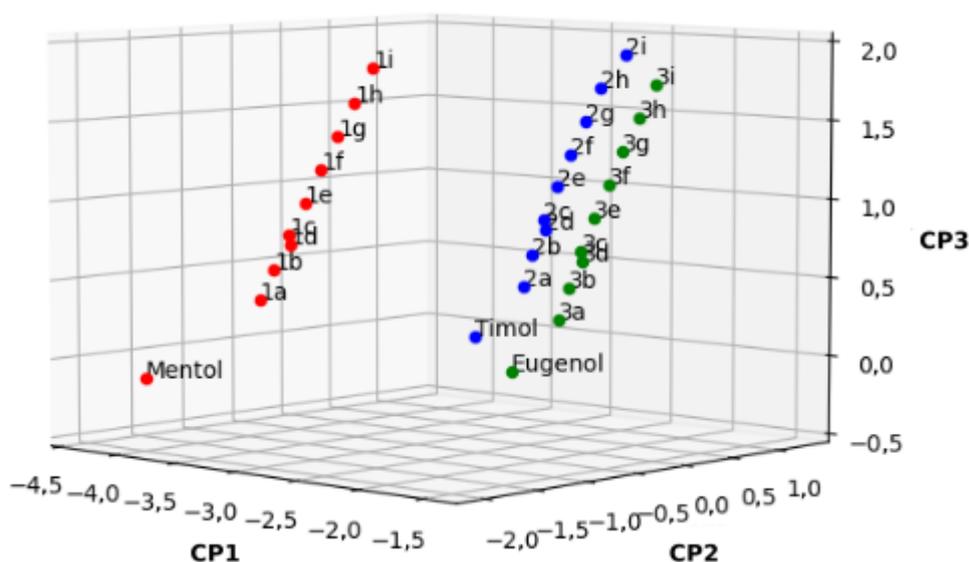


Figura 12. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo); Timol y **2a-i** (azul); Eugenol y **3a-i** (verde).

Analizamos el espacio químico y calculamos la distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Figura 13A-B), Leishmaniasis (Figura 14A-B) y Malaria (Figura 15A-B). Todas las estructuras químicas de los fármacos que se describen a continuación han sido mencionadas en el Capítulo I. Para la interpretación de los gráficos de distancia euclídea (Figuras B), se establece que mientras menor sea el valor de distancia euclídea mayor similitud estructural hay entre los compuestos evaluados (ver métodos).

2.3.3.1. Análisis del espacio químico para compuestos con actividad antiparasitaria

En relación a los compuestos con actividad tripanocida, observamos en la Figura 13A que tanto el Benznidazol (BNZ), el Nifurtimox (NX) como el Fexinidazol (FX) se encuentran concentrados en una zona estrecha del espacio fisicoquímico cercano al Mentol, Timol y Eugenol. El Mentol y sus derivados se hallan más alejados espacialmente del BNZ, NX y FX debido a la carencia de aromaticidad en sus estructuras (situadas en la dirección negativa de CP2). En cuanto al Posaconazol y Ravuconazol identificamos que comparten las propiedades lipofílicas con los derivados diseñados (situadas en la dirección positiva de CP3), contrario a los compuestos de partida.

En la Figura 13B se reporta que el BNZ, NX y FX poseen una distancia euclídea menor con respecto a los compuestos de partida y derivados en comparación al Posaconazol y Ravuconazol. Destacamos que el BNZ, NX y FX se posicionan más cerca a los derivados de cadena corta del Timol (**2a-d**) y Eugenol (**3a-d**), y a medida que la lipofílicidad de los derivados aumenta la distancia euclídea aumenta. Por consiguiente, predecimos que el Mentol, Timol y Eugenol y sus derivados podrían presentar una actividad biológica frente a *Trypanosoma* spp., más similar a los fármacos BNZ, NX y FX que Posaconazol y Ravuconazol. Lo anterior se debe fundamentalmente al principio de similitud, el cual plantea que moléculas con estructuras similares tienden a exhibir propiedades similares [46].

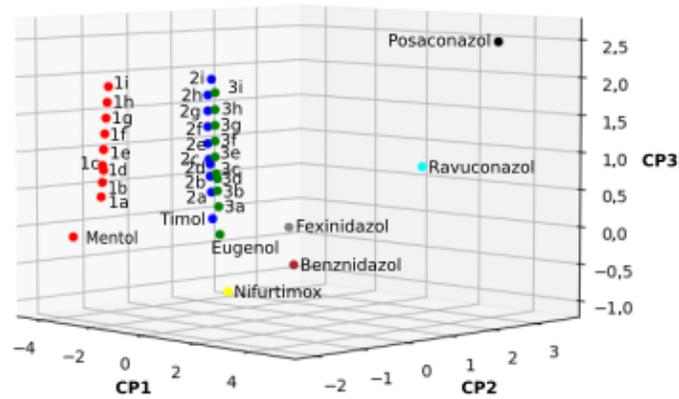
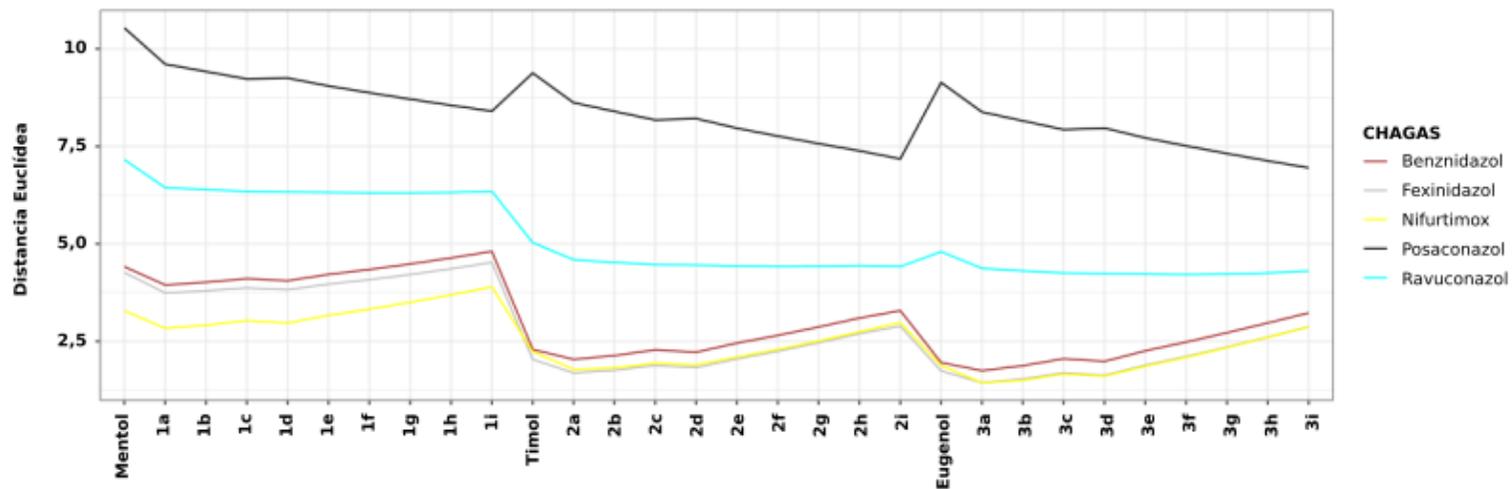
A.**B.**

Figura 13. A. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo), Timol y **2a-i** (azul) y Eugenol y **3a-i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox (amarillo), Benznidazol (marrón), Posaconazol (negro), Ravuconazol (cian) y Fexinidazol (gris). **B.** Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la enfermedad de Chagas.

En relación a los fármacos utilizados en el tratamiento de la Leishmaniasis, en la Figura 14A observamos que la Miltefosina se encuentra cerca dentro del espacio químico definido para nuestros compuestos de partida y los derivados diseñados. Si bien la Anfotericina B se encuentra cercana a nuestros derivados más lipofílicos (situadas en la dirección positiva de CP3), la misma posee un gran tamaño molecular (en relación con CP1) y propiedades aromáticas (en relación a CP2) mayor que los compuestos de partida y los derivados diseñados.

Lo mencionado anteriormente se identifica con mayor claridad en la Figura 14B, en la cual la Anfotericina B por más que presente una lipofílicidad similar a los derivados diseñados difiere en los otros tres componentes, esto da como resultado una distancia euclídea alta. En esta figura también detallamos que la Miltefosina tiene una similitud estructural mayor con los derivados del Mentol (**1a-i**). A su vez, en este gráfico se visualiza que a medida que se aumenta la lipofílicidad en cada serie de los derivados la similitud estructural con la Miltefosina es mayor.

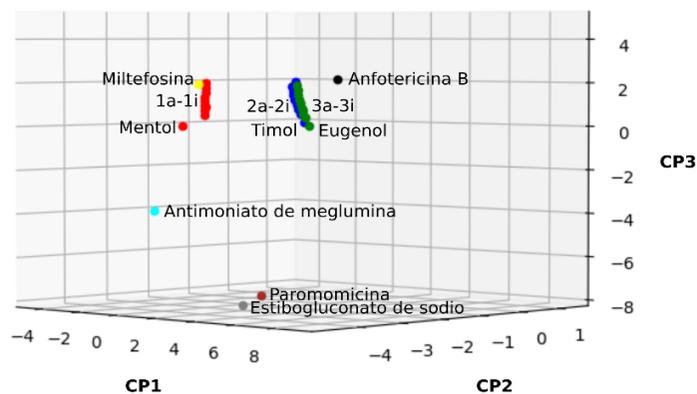
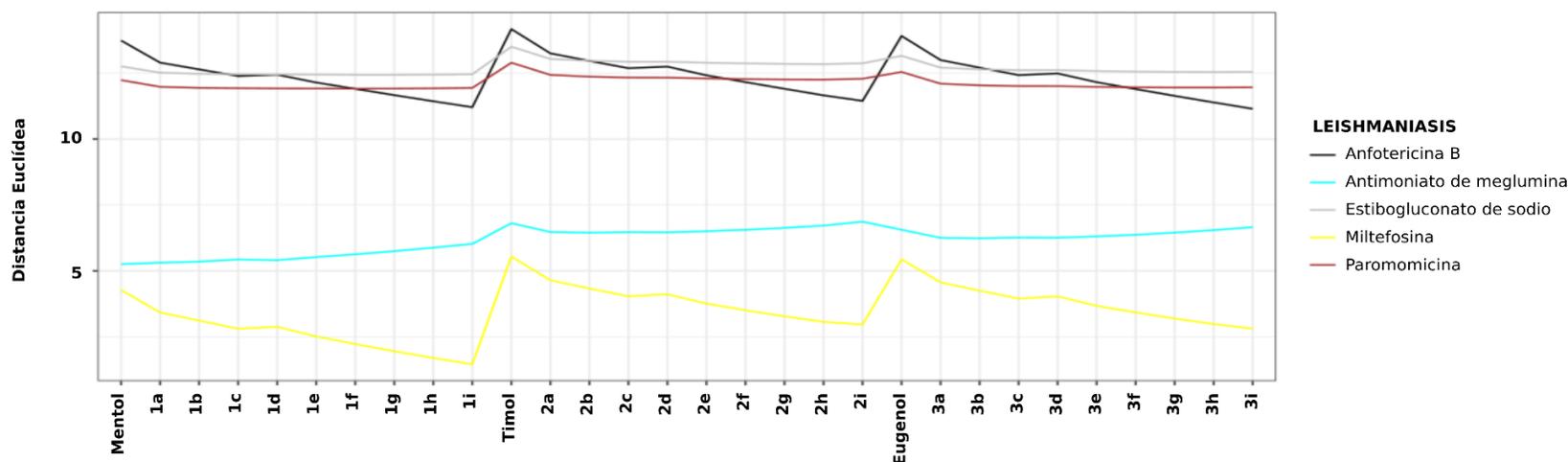
A.**B.**

Figura 14. **A.** Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-i** (rojo), Timol y **2a-i** (azul) y Eugenol y **3a-i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la Leishmaniasis: Miltefosina (amarillo), Anfotericina B (negro), Antimoniato de meglumina (cian), Paromomicina (marrón) y Estibogluconato de sodio (gris). **B.** Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la Leishmaniasis.

Con respecto al análisis del espacio químico para los fármacos utilizados en Malaria (Figura 15A) la mayoría de los fármacos se encuentran dentro de un espacio cercano a los compuestos de partida y derivados diseñados, a excepción de la Doxiciclina que posee un tamaño molecular mayor que los demás compuestos (situada en la dirección positiva de CP1).

En la Figura 15B diferenciamos que la Artemisina es el fármaco que posee la menor distancia euclídea con respecto al Mentol y sus derivados, en particular presenta mayor similitud con los derivados de cadena corta (**1a-d**). Este comportamiento se debe a que la Artemisina es una lactona sesquiterpénica, estructura química que no presenta aromaticidad al igual que la serie de Mentol. Es de destacar que la Artemisina es un compuesto natural que se aísla de la planta *Artemisia annua* [46]. En cuanto a la serie de Timol y Eugenol se identifica a la Cloroquina y Primaquina como los fármacos con mayor similitud estructural.

Con respecto a la Cloroquina, la distancia euclídea de todos los derivados es menor que al compuesto de partida, es decir los derivados de Timol y Eugenol son estructuralmente más similares que los compuestos de partida. Por otro lado, con la Primaquina observamos que a medida que los derivados poseen propiedades lipofílicas mayores la distancia euclídea es mayor.

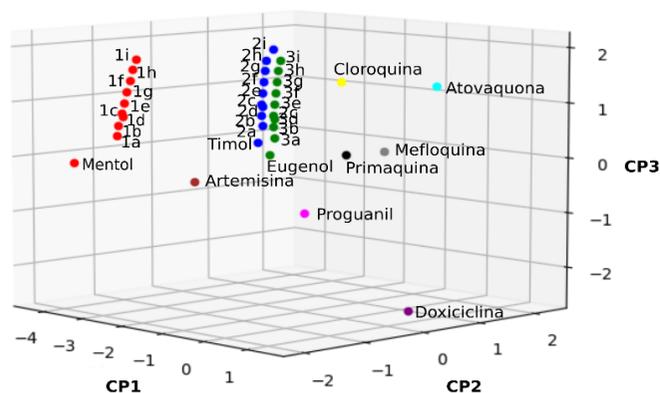
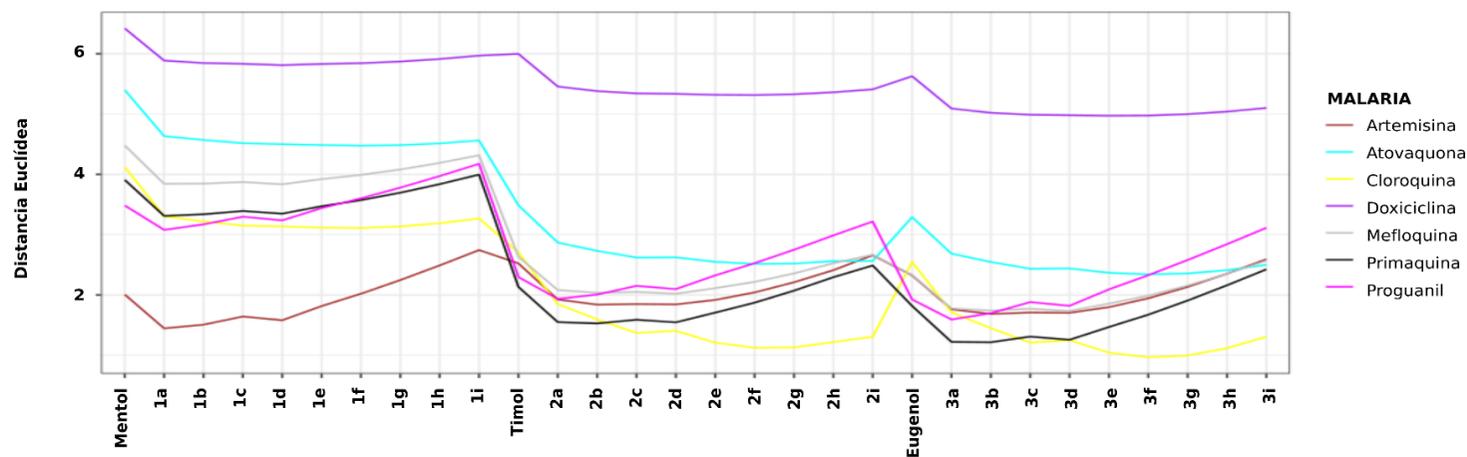
A.**B.**

Figura 15. A. Gráfico 3D del espacio químico del Mentol y **1a-1i** (rojo), Timol y **2a-2i** (azul) y Eugenol y **3a-3i** (verde), con respecto a los fármacos actuales y los nuevos fármacos que están en estudio avanzado para el tratamiento de la Malaria: Artemisina (marrón), Atovaquona (cyan), Cloroquina (amarillo), Doxiciclina (lila), Mefloquina (gris), Primaquina (negro) y Proguanil (magenta). **B.** Distancia euclídea de los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos farmacológicos actuales para la Malaria.

2.4. Discusión y conclusiones parciales

Debido a las particularidades y ventajas de los productos naturales que se describieron en el Capítulo I, en este Capítulo diseñamos prodrogas del Mentol (**1a-i**), Timol (**2a-i**) y Eugenol (**3a-i**) utilizando como complemento molecular alcoholes alifáticos de diferentes longitudes de la cadena alifática a través de una unión carbonato en el grupo hidroxilo del C-1 de los compuestos de partida. De esta manera, obtuvimos tres series homólogas de derivados con la finalidad de aumentar la actividad antiparasitaria a través de la modificación de propiedades fisicoquímicas.

Utilizamos varias herramientas quimioinformáticas para investigar las propiedades fisicoquímicas, la similitud molecular y la diversidad química de los compuestos de partida y de los derivados diseñados.

La predicción de la biodisponibilidad oral para las moléculas diseñadas es un parámetro muy importante, ya que al buscar diseñar nuevas entidades químicas que sean activas para EIDs, resulta relevante poder diseñar moléculas que puedan en un futuro ser desarrolladas para una administración oral debido a que, como se mencionó en el Capítulo I, estas enfermedades tienen alta incidencia y prevalencia en países subdesarrollados donde la adhesión de un tratamiento farmacológico, que no sea por vía oral, es reducida generando diferentes dificultades, cómo por ejemplo la aparición de resistencia farmacológica.

La administración de fármacos por vía oral en estas enfermedades es la más conveniente, ya que en general es la vía de administración más segura, la menos costosa, no se necesita de insumos ni de un gran número de profesionales calificados para la administración, como así también su distribución y almacenamiento son más sencillos. Debido a lo mencionado, el análisis de la regla de Lipinski y sus extensiones fue un filtro de alta relevancia en el cual nos permitió concluir que todos los compuestos diseñados cumplen con las reglas de Lipinski y reúnen todas las propiedades fisicoquímicas de fármacos del tipo “*drug-likeness*”.

La visualización del espacio químico, junto con el análisis de la distribución de los descriptores, permitió caracterizar la diversidad química de las tres series de prodrogas diseñadas. De esta manera, identificamos que los derivados se concentran en una zona del espacio fisicoquímico cercano al menos a un fármaco que actualmente se utiliza para la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria, prediciendo así una posible actividad

biológica exitosa basándonos en la hipótesis de que moléculas similares tienen una actividad biológica similar [45, 47]. En consecuencia, se decidió avanzar en las siguientes etapas de síntesis y evaluación de la actividad biológica.

2.5. Sección experimental

2.5.1. Filtros “*drug-likeness*”

Para determinar los parámetros fisicoquímicos y evaluar la regla Lipinski, como así también sus extensiones (peso molecular, lipofilia, donantes de enlaces de hidrógeno, aceptores de enlaces de hidrógeno, enlaces rotables y área de superficie polar topográfica) se utilizó el programa SwissADME [48].

2.5.2. Análisis del espacio químico

El espacio químico se estudió mediante la herramienta de navegación del espacio químico basada en el análisis de componentes principales ChemGPS y ChemGPS-NP [42-44], que está disponible en línea de forma gratuita (<http://www.chemgps.bmc.uu.se/>). Este análisis se realiza a partir de descriptores 2D que describen las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y se calculan a partir de los SMILES. Las notaciones de SMILES se obtuvieron a través del software ChemSketch v.12.01 (Advanced Chemistry Development Inc., ACD Laboratories, 2010) con licencia académica (Tabla 3). La visualización del espacio químico se realizó en un espacio tridimensional, y los gráficos se construyeron utilizando la librería de MATLAB de python3.

Para identificar la similitud estructural entre los compuestos de partida y los derivados diseñados frente a los tratamientos existentes para las enfermedades en estudio se calcularon las distancias euclidianas, deducidas a partir del teorema de Pitágoras. Se calcularon entre los puntos $P = (p_1, p_2, p_3)$ y $Q = (q_1, q_2, q_3)$ en el espacio euclidiano de tres dimensiones (PCAs) proporcionado por las coordenadas ChemGPS y ChemGPS-NP de acuerdo a la ecuación 1.

$$dE(P, Q) = \sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + (p_3 - q_3)^2} \text{ ec. 1}$$

Tabla 3. SMILES de los compuestos analizados

Serie del Mentol	
Mentol	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](O)C1</chem>
1a	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OC)=O)C1</chem>
1b	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCC)=O)C1</chem>
1c	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCC)=O)C1</chem>
1d	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OC(C)C)=O)C1</chem>
1e	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCCC)=O)C1</chem>
1f	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCCCC)=O)C1</chem>
1g	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCCCCC)=O)C1</chem>
1h	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCCCCCC)=O)C1</chem>
1i	<chem>C[C@H]1CC[C@H](C(C)C)[C@@H](OC(OCCCCCCCC)=O)C1</chem>
Serie del Timol	
Timol	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(O)=C1</chem>
2a	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OC)=O)=C1</chem>
2b	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCC)=O)=C1</chem>
2c	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCC)=O)=C1</chem>
2d	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OC(C)C)=O)=C1</chem>
2e	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCCC)=O)=C1</chem>
2f	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCCCC)=O)=C1</chem>
2g	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCCCCC)=O)=C1</chem>
2h	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCCCCCC)=O)=C1</chem>
2i	<chem>CC1=CC=C(C(C)C)C(OC(OCCCCCCCC)=O)=C1</chem>
Serie del Eugenol	
Eugenol	<chem>OC1=CC=C(CC=C)C=C1OC</chem>
3a	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OC)=O)C(OC)=C1</chem>

3b	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3c	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3d	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OC(C)C)=O)C(OC)=C1</chem>
3e	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3f	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3g	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCCCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3h	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCCCCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
3i	<chem>C=CCC1=CC=C(OC(OCCCCCCCC)=O)C(OC)=C1</chem>
Fármacos actuales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas	
Nifurtimox	<chem>CC1CS(=O)(=O)CCN1N=CC2=CC=C(O2)[N+](=O)[O-]</chem>
Benznidazol	<chem>C1=CC=C(C=C1)CNC(=O)CN2C=CN=C2[N+](=O)[O-]</chem>
Posaconazol	<chem>CCC(C(C)O)N1C(=O)N(C=N1)C2=CC=C(C=C2)N3CCN(CC3)C4=CC=C(C=C4)OCC5CC(OC5)(CN6C=NC=N6)C7=C(C=C(C=C7)F)F</chem>
Ravuconazol	<chem>CC(C1=NC(=CS1)C2=CC=C(C=C2)C#N)C(CN3C=NC=N3)(C4=C(C=C(C=C4)F)F)O</chem>
Fexinidazol	<chem>CN1C(=CN=C1COC2=CC=C(C=C2)SC)[N+](=O)[O-]</chem>
Fármacos actuales para el tratamiento de Leishmaniasis	
Estibogluconato de sodio	<chem>C(C(C1C(C(O[Sb](=O)(O1)O[Sb]2(=O)OC(C(C(O2)C(=O)[O-])O)C(CO)O)C(=O)[O-])O)O)O.O.O.O.O.O.O.O.O.O.[Na+].[Na+].[Na+]</chem>
Antimoniato de meglumina	<chem>C(C(C1C(C(O[Sb](=O)(O1)O[Sb]2(=O)OC(C(C(O2)C(=O)[O-])O)C(CO)O)C(=O)[O-])O)O)O.O.O.O.O.O.O.O.O.O.[Na+].[Na+].[Na+]</chem>
Anfotericina B	<chem>CC1C=CC=CC=CC=CC=CC=CC(CC2C(C(CC(O2))(CC(CC(C(CCC(CC(CC(=O)OC(C(C1O)C)C)O)O)O)O)O)O)C(=O)O)OC3C(C(C(C(O3)C)O)N)O</chem>
Paromomicina	<chem>C1C(C(C(C(C1N)OC2C(C(C(C(O2)CO)O)O)N)OC3C(C(C(O3)CO)OC4C(C(C(C(O4)CN)O)O)N)O)O)N</chem>
Miltefosina	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCOP(=O)([O-])OCC[N+](C)(C)C</chem>
Fármacos actuales para el tratamiento de Malaria	

Cloroquina	<chem>CCN(CC)CCCC(C)NC1=C2C=CC(=CC2=NC=C1)Cl</chem>
Artemisina	<chem>CC1C2C(CC3(C=CC(=O)C(=C3C2OC1=O)C)C)O</chem>
Primaquina	<chem>CC(CCCN)NC1=C2C(=CC(=C1)OC)C=CC=N2</chem>
Atovaquona	<chem>C1CC(CCC1C2=CC=C(C=C2)Cl)C3=C(C4=CC=CC=C4C(=O)C3=O)O</chem>
Mefloquina	<chem>C1CCNC(C1)C(C2=CC(=NC3=C2C=CC=C3C(F)(F)F)C(F)(F)F)O</chem>
Proguanil	<chem>CC(C)N=C(N)N=C(N)NC1=CC=C(C=C1)Cl</chem>
Doxiciclina	<chem>CC1C2C(C3C(C(=O)C)=C(C3(C(=O)C2=C(C4=C1C=CC=C4O)O)O)C(=O)N)N(C)C)O</chem>

2.6. Bibliografía

- [1] J. M. Mérillon & C. Riviere, *Natural antimicrobial agents*, vol. 19. Springer, 2018.
- [2] L. Monzote, O. Alarcón & W. N. Setzer, “Antiprotozoal activity of essential oils”, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, vol. 77, no. 4, pp. 167-175, 2012.
- [3] J. Rao, B. Chen & D. J. McClements, “Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action”, *Annual review of food science and technology*, vol. 10, pp. 365-387, 2019.
- [4] S. H. Park, Y. B. Sim, J. K. Lee, S. M. Kim, Y.-J. Kang, J. S. Jung & H. W. Su, “The analgesic effects and mechanisms of orally administered Eugenol”, *Archives of Pharmacal Research*, vol. 34, no. 3, pp. 501-507, 2011.
- [5] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, A. Gouch, B. Lyoussi & A. Abdellaoui, “Antibacterial efficacy of thymol, carvacrol, Eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of nosocomial infection-bacteria”, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 11, no. 2, pp. 306-309, 2019.
- [6] S. Abbaszadeh, A. Sharifzadeh, H. Shokri, A. Khosravi & A. Abbaszadeh, “Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, Eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi”, *Journal de mycologie medicale*, vol. 24, no. 2, pp. e51-e56, 2014.
- [7] D. J. Taylor, S. M. Hamid, A. M. Andres, H. Saadaejahromi, H. Piplani, J. F. Germano, Y. Song, S. Sawaged, R. Feuer, S. J. Pandol, *et al.*, “Antiviral effects of menthol on

coxsackievirus b”, *Viruses*, vol. 12, no. 4, p. 373, 2020.

[8] F. Benencia & M. Courreges, “In vitro and in vivo activity of Eugenol on human herpesvirus”, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, vol. 14, no. 7, pp. 495-500, 2000.

[9] J. Sharifi-Rad, B. Salehi, N. Baghalpour, F. Kobarfard, M. Sharifi-Rad & M. Mohammadzade, “Antiviral activity of monoterpenes thymol, carvacrol and p-cymene against herpes simplex virus in vitro”, *International Pharmacy Acta*, vol. 1, no. 1, pp. 73-73, 2018.

[10] R. C. V. de Carvalho, V. C. de Sousa, L. P. Santos, I. L. Dos Santos, R. C. Diniz, R. R. L. Rodrigues, M. d. G. F. de Medeiros, K. A. da Franca Rodrigues, M. M de Moraes Alves, D. D. R. Arcanjo, *et al.*, “Limonene-carvacrol: A combination of monoterpenes with enhanced antileishmanial activity”, *Toxicology in Vitro*, vol. 74, p. 105158, 2021.

[11] S. M. de Moraes, N. S. Vila-Nova, C. M. L. Bevilaqua, F. C. Rondon, C. H. Lobo, A. D. A. A. N. Moura, A. D. Sales, A. P. R. Rodrigues, J. R. de Figueredo, C. C. Campello, *et al.*, “Thymol and Eugenol derivatives as potential antileishmanial agents”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 22, no. 21, pp. 6250-6255, 2014.

[12] M. G. Zaia, T. d. O. Cagnazzo, K. A. Feitosa, E. G. Soares, L. H. Faccioli, S. M. Allegretti, A. Afonso & F. d. F. Anibal, “Anti-inflammatory properties of menthol and menthone in schistosoma mansoni infection”, *Frontiers in pharmacology*, vol. 7, p. 170, 2016.

[13] A. N. Daniel, S. M. Sartoretto, G. Schmidt, S. M. Caparroz-Assef, C. A. Bersani-Amado & R. K. N. Cuman, “Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Eugenol essential oil in experimental animal models”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19, pp. 212-217, 2009.

[14] P. C. Braga, M. Dal Sasso, M. Culici, T. Bianchi, L. Bordoni & L. Marabini, “Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase”, *Pharmacology*, vol. 77, no. 3, pp. 130-136, 2006.

[15] A. K. Chauhan & S. C. Kang, “Thymol disrupts the membrane integrity of salmonella ser. Typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex

vivo model”, *Research in microbiology*, vol. 165, no. 7, pp. 559-565, 2014.

[16] D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti & G. Bisignano, “Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 49, no. 6, pp. 2474-2478, 2005.

[17] A. Gill & R. Holley, “Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics”, *International journal of food microbiology*, vol. 111, no. 2, pp. 170-174, 2006.

[18] A. Boye, J. K. Addo, D. O. Acheampong, A. K. Thomford, E. Asante, R. E. Amoaning & D. N. Kuma. “The hydroxyl moiety on carbon one (C1) in the monoterpene nucleus of thymol is indispensable for anti-bacterial effect of thymol”, *Heliyon*, vol. 6, no. 3, p. e03492, 2020.

[19] A. R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli & M. C. Bergonzi, “Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2014, 2014.

[20] S. Tharamak, T. Yooboon, A. Pengsook, A. Ratwatthananon, N. Kumrungsee, V. Bullangpoti & W. Pluempanupa, “Synthesis of thymyl esters and their insecticidal activity against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)”, *Pest management science*, vol. 76, no. 3, pp. 928-935, 2020.

[21] F. Brown, “Editorial opinion: Chemoinformatics-a ten year update”, *Current opinion in drug discovery & development*, vol. 8, no. 3, pp. 298-302, 2005.

[22] Y. Chen & J. Kirchmair, “Cheminformatics in natural product-based drug discovery”, *Molecular informatics*, vol. 39, no. 12, p. 2000171, 2020.

[23] H. Chen, T. Kogej & O. Engkvist, “Cheminformatics in drug discovery, an industrial perspective”, *Molecular informatics*, vol. 37, nos. 9-10, p. 1800041, 2018.

[24] C. Hertweck, “Natural products as source of therapeutics against parasitic diseases”, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 54, no. 49, pp. 14622-14624, 2015.

[25] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy & P. J. Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings”, *Advanced drug delivery reviews*, vol. 23, nos. 1-3, pp. 3-25, 1997.

[26] C. A. Lipinski, “Lead-and drug-like compounds: The rule-of-five revolution”, *Drug*

discovery today: Technologies, vol. 1, no. 4, pp. 337-341, 2004.

[27] A. L. Hopkins & C. R. Groom, “The druggable genome”, *Nature reviews Drug discovery*, vol. 1, no. 9, pp. 727-730, 2002.

[28] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan & J. J. Wendoloski, “A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases”, *Journal of combinatorial chemistry*, vol. 1, no. 1, pp. 55-68, 1999.

[29] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward & K. D. Kopple, “Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 2615-2623, 2002.

[30] C. Lipinski & A. Hopkins, “Navigating chemical space for biology and medicine”, *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 855-861, 2004.

[31] R. Buonfiglio, O. Engkvist, P. Varkonyi, A. Henz, E. Vikeved, A. Backlund & T. Kogej, “Investigating pharmacological similarity by charting chemical space”, *Journal of chemical information and modeling*, vol. 55, no. 11, pp. 2375-2390, 2015.

[32] J. L. Reymond, R. Van Deursen, L. C. Blum & L. Ruddigkeit, “Chemical space as a source for new drugs”, *MedChemComm*, vol. 1, no. 1, pp. 30-38, 2010.

[33] R. S. Bohacek, C. McMartin & W. C. Guida, “The art and practice of structure-based drug design: A molecular modeling perspective”, *Medicinal research reviews*, vol. 16, no. 1, pp. 3-50, 1996.

[34] C. M. Dobson *et al.*, “Chemical space and biology”, *Nature*, vol. 432, no. 7019, pp. 824-828, 2004.

[35] J. L. Medina-Franco, K. Martínez-Mayorga, M. A. Giulianotti, R. A. Houghten & C. Pinilla, “Visualization of the chemical space in drug discovery”, *Current Computer-Aided Drug Design*, vol. 4, no. 4, pp. 322-333, 2008.

[36] H. M. Geysen, F. Schoenen, D. Wagner & R. Wagner, “Combinatorial compound libraries for drug discovery: An ongoing challenge”, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 2, no. 3, pp. 222-230, 2003.

[37] P. Ertl, “Cheminformatics analysis of organic substituents: Identification of the most common substituents, calculation of substituent properties, and automatic identification of

drug-like bioisosteric groups”, *Journal of chemical information and computer sciences*, vol. 43, no. 2, pp. 374-380, 2003.

[38] J. L. Medina-Franco, N. Sánchez-Cruz, E. López-López & B. I. Díaz-Eufracio, “Progress on open chemoinformatic tools for expanding and exploring the chemical space”, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, pp. 1-14, 2021.

[39] S. Ravetti, M. S. Gualdesi & M. C. Brinon, “Lipophilicity of 5'-carbonates of lamivudine with antiretroviral activity. Correlation between different methods”, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, vol. 31, no. 7, pp. 1014-1032, 2008.

[40] S. Ravetti, M. S. Gualdesi, J. S. Trincherro-Hernández, G. Turk & M. C. Briñón, “Synthesis and anti-hiv activity of novel 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine prodrugs”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 17, no. 17, pp. 6407-6413, 2009.

[41] D. Gagey, S. Ravetti, E. F. Castro, M. S. Gualdesi, M. C. Brinon, R. H. Campos & L. V. Cavallaro, “Antiviral activity of 5'-o-carbonate-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine prodrugs against hepatitis b virus in hepg2 2.2. 15 cells”, *International journal of antimicrobial agents*, vol. 36, no. 6, pp. 566-569, 2010.

[42] J. Larsson, J. Gottfries, S. Muresan & A. Backlund, “ChemGPS-np: Tuned for navigation in biologically relevant chemical space”, *Journal of natural products*, vol. 70, no. 5, pp. 789-794, 2007.

[43] J. Larsson, J. Gottfries, L. Bohlin & A. Backlund, “Expanding the chemgps chemical space with natural products”, *Journal of natural products*, vol. 68, no. 7, pp. 985-991, 2005.

[44] J. Rosén, A. Lövgren, T. Kogej, S. Muresan, J. Gottfries & A. Backlund, “ChemGPS-np web: Chemical space navigation online”, *Journal of computer-aided molecular design*, vol. 23, no. 4, pp. 253-259, 2009.

[45] M. A. Johnson & G. M. Maggiora, “Concepts and applications of molecular similarity”, *Wiley*, 1990.

[46] P. J. Weathers, P. R. Arsenault, P. S. Covello, A. McMickle, K. H. Teoh & D. W. Reed, “Artemisinin production in *artemisia annua*: Studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases”, *Phytochemistry Reviews*, vol. 10, no. 2, pp. 173-183, 2011.

[47] Y. C. Martin, J. L. Kofron & L. M. Traphagen, “Do structurally similar molecules have

similar biological activity?”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 19, pp. 4350-4358, 2002.

[48] A. Daina, O. Michielin & V. Zoete, “SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules”, *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-13, 2017.

CAPÍTULO IV

Síntesis y elucidación estructural de nuevos derivados del Mentol, Timol y Eugenol

3.1. Consideraciones generales

El descubrimiento de fármacos ha utilizado y utiliza tanto las fuentes de productos naturales como la síntesis orgánica para proporcionar moléculas candidatas para su posterior optimización. La producción de estas nuevas moléculas de manera eficiente en cuanto a tiempo, calidad y costos se ha convertido en una de las tareas más importantes de las ciencias químicas [1].

La síntesis orgánica es una herramienta clave para la transformación de compuestos naturales bioactivos en derivados con propiedades más parecidas a los fármacos (“*drug-likeness*”) [2]. Se han desarrollado muchos enfoques sintéticos novedosos para aumentar la diversidad estructural; en otras palabras, para ampliar el espacio químico de las moléculas investigadas, cómo así también, diferentes estrategias sintéticas novedosas en un esfuerzo por obtener compuestos potenciales con valor medicinal [3, 4].

En una revisión bibliográfica de modificaciones estructurales realizadas en los monoterpenos como los son el Mentol, Timol y Eugenol, mayoritariamente se destacan sustituciones en el grupo hidroxilo (único grupo funcional) con la finalidad de obtener amidas, ésteres, carbamatos, oxipropanolaminas, sulfamatos, entre otros [5-11]. En menor medida, se identificaron modificaciones estructurales en el núcleo y en las cadenas carbonadas [12, 13]. Principalmente, todas estas modificaciones estructurales se realizaron con motivo de aumentar la selectividad y potencia frente a las diversas actividades biológicas ensayadas.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Sintetizar los nuevos compuestos **1a-i**, **2a-i** y **3a-i** diseñados en el Capítulo III a través de una

metodología de síntesis sencilla que conlleve a buenos rendimientos y realizar una elucidación estructural completa utilizando técnicas espectroscópicas ampliamente aceptadas para la identificación y determinación de la estructura química.

3.2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar los nuevos derivados **1a-i**, **2a-i** y **3a-i** mediante una sustitución nucleofílica.
- Caracterizar a los compuestos a través de Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV).
- Caracterizar a los compuestos a través de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).
- Caracterizar a los compuestos a través de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN-¹H), Resonancia Magnética de Carbono (RMN-¹³C), y técnicas bidimensionales como COSY (del inglés, *Correlations Spectroscopy*), HSQC (del inglés, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) y HMBC (del inglés, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).
- Caracterizar a los compuestos a través de Espectroscopia de Masas de Alta Resolución (HRMS).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Síntesis de carbonatos de Mentol, Timol y Eugenol

Para la unión de moléculas a través del grupo hidroxilo en la posición 1' del Mentol, Timol y Eugenol, propusimos la formación de un intermediario de reacción que nos diera la posibilidad de sintetizar los nuevos derivados propuestos.

Para la obtención de amidas, ésteres, ureas, carbamatos y carbonatos se usan comúnmente como intermediarios cloruros de carbonilo, tales como fosgeno (COCl₂), cloroformatos (ClCO₂R), cloruros de ácido (RCOCl) y cloruros de carbamoilo (R₂NCOCl). Los mismos presentan ciertas desventajas: elevada toxicidad, inestabilidad hidrolítica y dificultad para su aislamiento, motivo por el cual se ha seleccionado como alternativa de síntesis, el empleo de “azólidas”. Este término se refiere a las amidas heterocíclicas cuyo átomo de nitrógeno forma parte de un anillo de cinco miembros *cuasiaromático*, y cuyo anillo contiene al menos dos átomos de nitrógeno. A diferencia del resto de las amidas, el elevado grado de reactividad de las azólidas frente a las reacciones nucleofílicas es ciertamente sorprendente, siendo similar al que presentan los halogenuros de acilo y los anhídridos [14].

Dentro del grupo de estas azólicas, el 1',1'-carbonildiimidazol (CDI) es un reactivo ampliamente utilizado en la síntesis de pequeñas moléculas, especialmente en la química medicinal [15-20]. Desde su primera síntesis en 1957 [14, 21], el CDI se ha utilizado para diversas aplicaciones en síntesis orgánica. Debido a su naturaleza electrofílica, se ha utilizado para reaccionar principalmente con ácidos carboxílicos, alcoholes y aminas [22]. La seguridad de sus productos secundarios, a saber, el imidazol y el dióxido de carbono, es de especial interés en una época en la que el impacto medioambiental es cada vez más importante [23].

De esta manera, cuando CDI reacciona con el grupo hidroxilo del Mentol, Timol y Eugenol, se forma un intermediario (Mentol-CI, Timol-CI y Eugenol-CI, respectivamente), cuyo grupo carbonilo es muy susceptible al ataque nucleofílico de alcoholes primarios, obteniéndose así los 1-carbonatos de Mentol, Timol y Eugenol.

En la primera etapa, el grupo hidroxilo del monoterpeno reacciona cuantitativamente con CDI, dando un carbamato como producto intermediario. Posteriormente, en una segunda etapa, por adición de los alcoholes seleccionados (metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-octanol) se forman los correspondientes carbonatos (Figura 16, 17 y 18).

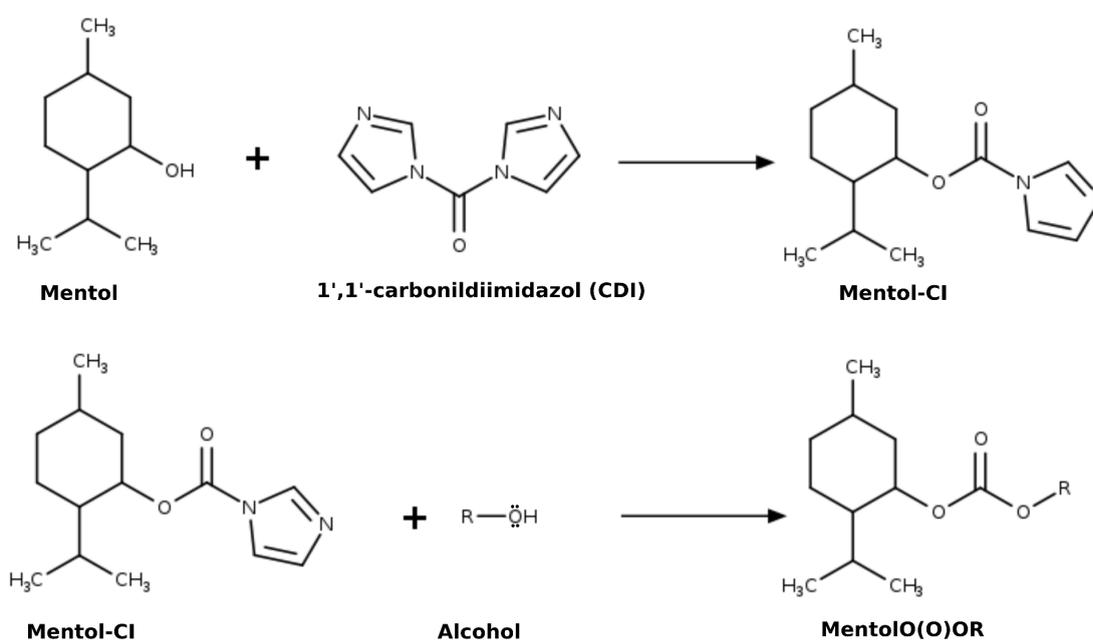


Figura 16. Reacción general para la formación de carbonatos de Mentol.

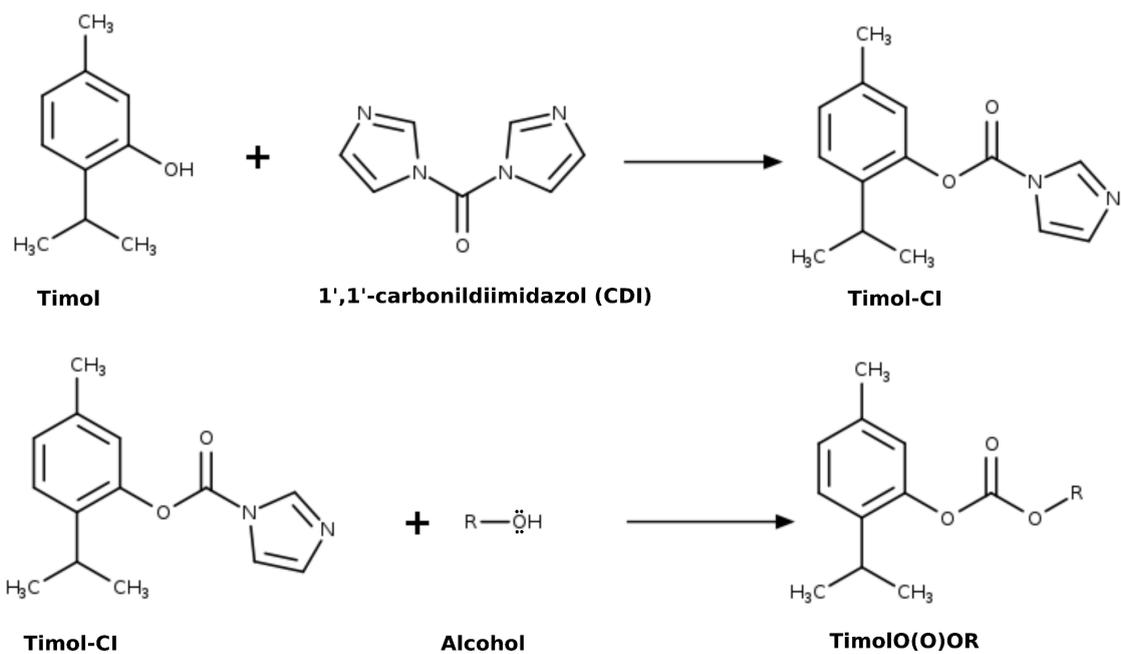


Figura 17. Reacción general para la formación de carbonatos de Timol.

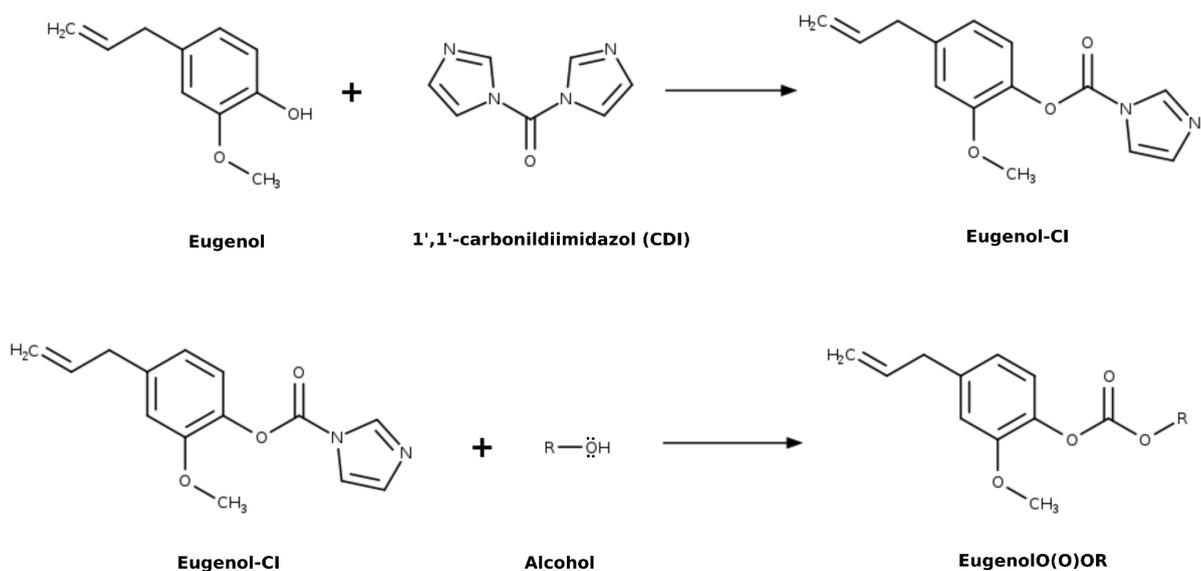


Figura 18. Reacción general para la formación de carbonatos de Eugenol.

Estudiamos diferentes condiciones de reacción, encontrándose que los mejores rendimientos se obtuvieron disolviendo los monoterpenos en diclorometano (CH_2Cl_2) en exceso, bajo atmósfera de N_2 , a temperatura ambiente y con agitación, previo al agregado de CDI [24-26]. Se utilizó una relación CDI:monoterpeno de 1:1,2 para evitar la formación del carbonato por unión de dos moléculas de monoterpeno.

Luego de confirmar por Cromatografía en Capa Fina (CCF) la desaparición total del monoterpeno, se agrega *in situ* el alcohol correspondiente, manteniendo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de varias horas (dependiendo del alcohol utilizado) observamos la formación de los nuevos derivados.

Para la purificación de los compuestos realizamos el siguiente procedimiento, al crudo de reacción le realizamos extracciones sucesivas con diclorometano/agua ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$), con el fin de separar el exceso de CDI sin reaccionar, obteniéndose los compuestos sintetizados en la fase orgánica. Posteriormente, la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el solvente se evaporó empleando un evaporador rotatorio dando como resultado el compuesto puro en forma de aceite en todos los casos. Los rendimientos de las reacciones luego de la purificación oscilaron entre 81%-89% (ver métodos).

3.3.2. Determinación de la estructura química

Los nuevos derivados sintetizados (Figuras 19-21) los caracterizamos utilizando diversas técnicas espectroscópicas ampliamente aceptadas para la identificación y determinación de la estructura química. Entre ellas podemos mencionar a la Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN- ^1H), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN- ^{13}C) con sus variantes mono y bidimensionales, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) y Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV). A través de estas técnicas demostramos que todos los compuestos estudiados respondieron correctamente a la estructura propuesta. Los espectros obtenidos de cada compuesto que a continuación se detallan, se muestran en el Anexo I, II y III.

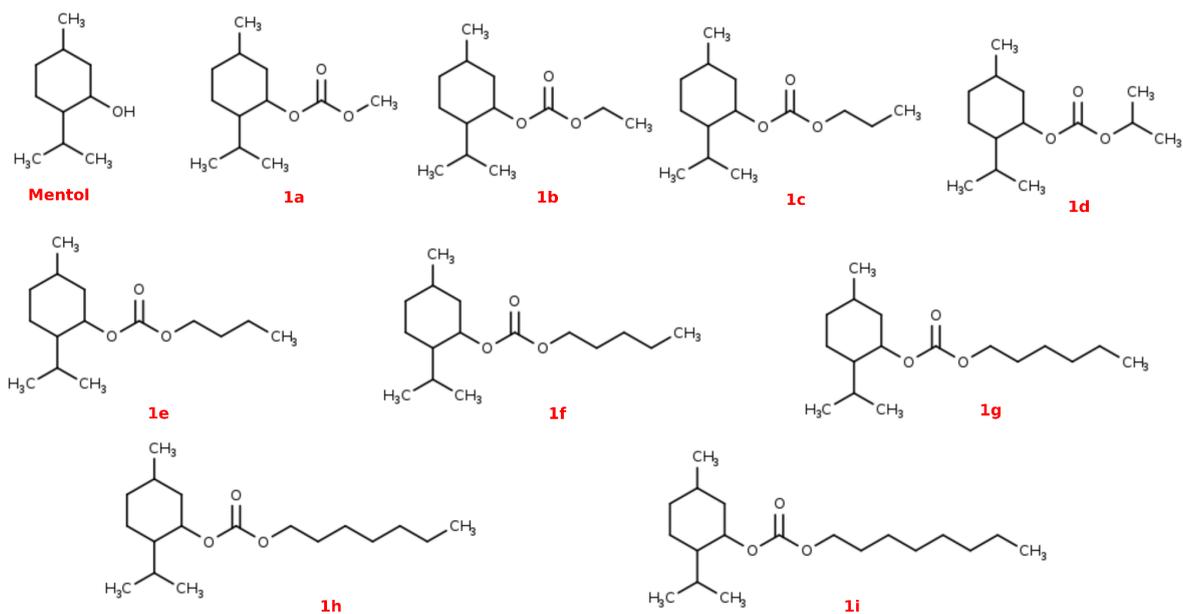


Figura 19. Mentol y compuestos 1a-i.

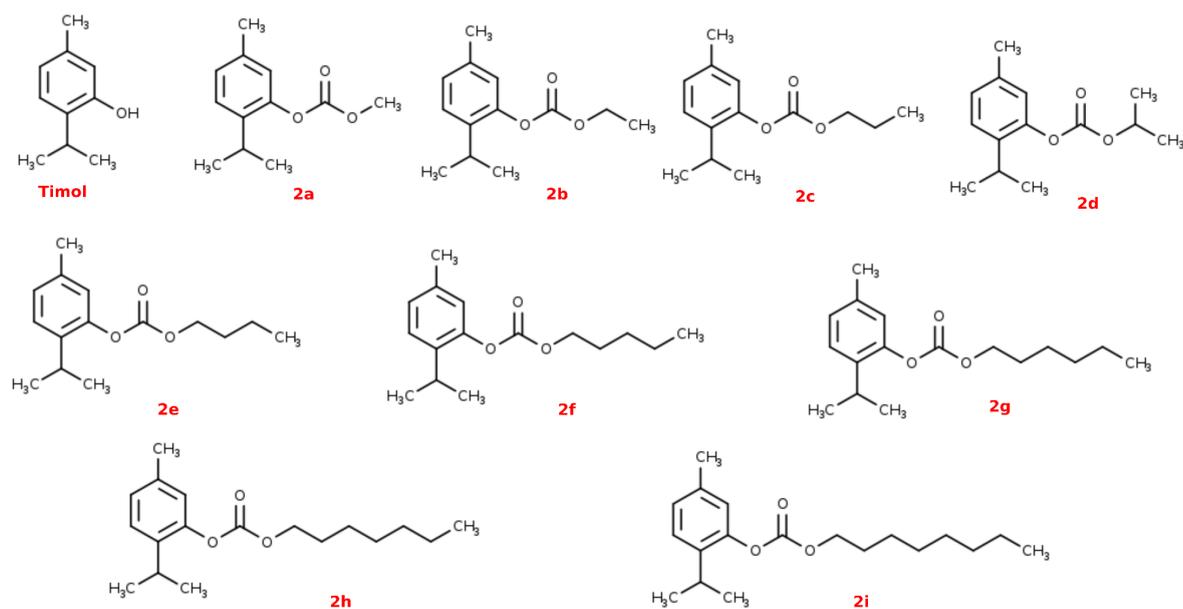


Figura 20. Timol y compuestos 2a-i.

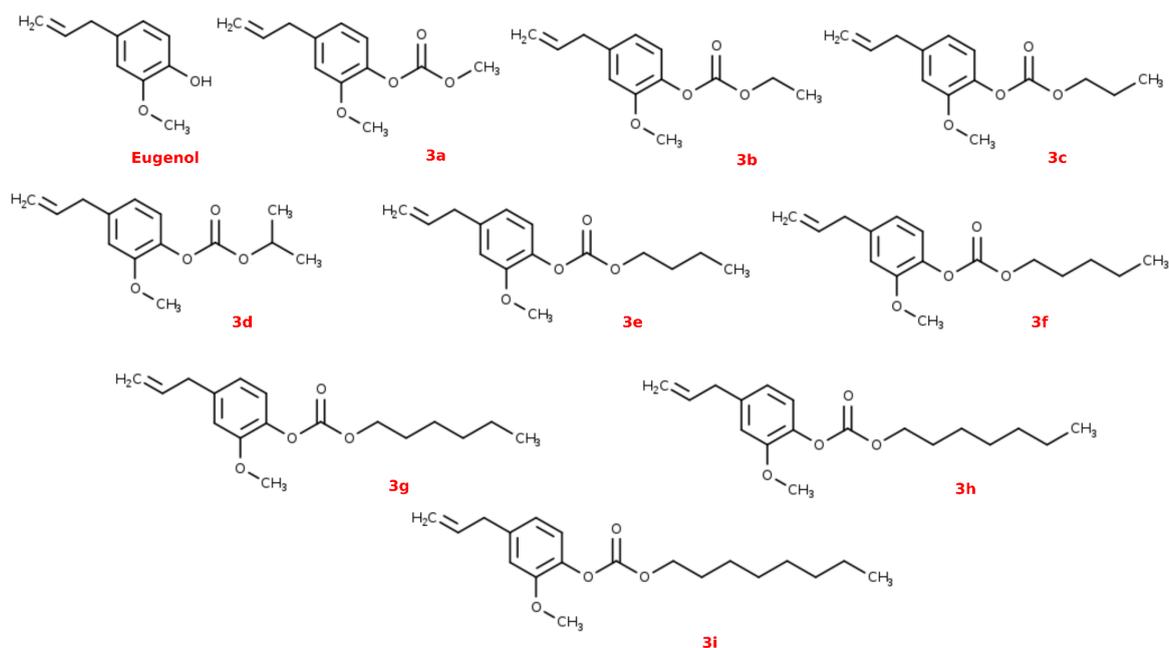


Figura 21. Eugenol y compuestos **3a-i**.

3.3.2.1. Resonancia Magnética Nuclear de Protones

En la sección 3.5.3 de este Capítulo se muestran los corrimientos químicos correspondientes a los espectros de RMN-¹H de los compuestos de partida y los nuevos derivados **1a-i**, **2a-i** y **3a-i**. Para asignar las señales observadas en los espectros de los derivados comparamos con las del compuesto de partida, CDI y alcoholes correspondientes en cada caso, ajustándose las mismas a las estructuras propuestas. Identificamos en cada caso, las señales características tanto de los compuestos de partida como de los nuevos derivados. Debido a que la sustitución se realiza en el grupo -OH de cada compuestos de partida, observamos que el protón H-1 del Mentol posee un corrimiento de 3,4 ppm mientras que en los derivados **1a-i** esta señal se observa a campos más bajos (4,8 ppm). Debido a que el Timol y Eugenol estructuralmente poseen un anillo aromático, este corrimiento a campos bajos se observa en el H-6. Una evidencia importante relacionada con la estructura de estos nuevos compuestos son las señales características de los alcoholes alifáticos.

En los espectros de los derivados, se destacan las señales correspondientes a las cadenas alifáticas de los alcoholes seleccionados, los cuales aparecen en 0,7 y 0,9 ppm, a excepción de los derivados con metanol (**1a**, **2a** y **3a**) que se reportan a ≈3,5-4,0 ppm y etanol (**1b**, **2b** y **3b**) en ≈1,3-2,0 ppm. Esto último se debe al efecto de desapantallamiento que ejerce el grupo

funcional en la posición del C-11.

3.3.2.2. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

En la sección 3.5.3 de este Capítulo se muestran los corrimientos químicos correspondientes a los espectros de RMN-¹³C de los compuestos de partida y los nuevos derivados **1a-i**, **2a-i** y **3a-i**. El C-1 de los derivados mostró diferencias en los corrimientos químicos con respecto al C-1 de los compuestos de partida, por efecto de los grupos sustituyentes en el oxígeno. La señal característica más significativa es la señal correspondiente al carbono del carbonato (C-11) con un corrimiento de 148-154 ppm. La aparición de esta señal que corresponde al grupo carbonato, ausente en los compuestos de partida, confirma la obtención de los nuevos compuestos.

Los espectros bidimensionales COSY (¹H-¹H) permitieron correlacionar los protones vecinos de cada una de las moléculas, mientras que los espectros bidimensionales, HSQC y HMBC (¹³C-¹H) permitieron correlacionar cada protón de la molécula con su correspondiente carbono.

3.3.2.3. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR tiene utilidad como método de asignación de estructuras en nuevos compuestos, ya que permite relacionar las frecuencias de ciertas bandas de absorción con la presencia de determinados enlaces o grupos funcionales en la molécula. En el espectro de absorción del Mentol, Timol y Eugenol se observan las señales de los grupos -OH las cuales aparecen en la región comprendida entre 3175-3510 cm⁻¹. La identificación de las bandas de absorción de los derivados **1a-i**, **2a-i** y **3a-i** se basó en la comparación de los infrarrojos de los nuevos derivados con los compuestos de partida y alcoholes correspondientes. Los datos espectrales FTIR mostraron la banda característica del estiramiento OC(O)O en el rango de 1760 a 1778 cm⁻¹ y la desaparición de la banda correspondiente al grupo hidroxilo presente en los compuestos de partida. Ambas características confirman inequívocamente la formación de carbonatos.

3.3.2.4. Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV)

Tanto el Mentol como sus derivados no se midieron por esta técnica debido a la ausencia de un grupo cromóforo. Las curvas espectrales de los derivados **2a-i** y **3a-i** y de sus compuestos de partida presentaron las mismas bandas de absorción debido a que la sustitución química

realizada en los compuestos de partida no produce un cambio estructural en el grupo cromóforo.

De esta manera, tanto en el espectro UV del Timol como en el de los derivados **2a-i** se pueden apreciar dos bandas de absorción de diferentes intensidades, situándose los máximos de longitud de onda de 213 y 277 nm (Figura 22-A). En cuanto al Eugenol y los derivados **3a-i** se observan tres bandas de absorción de diferentes intensidades en 213, 230 y 282 nm (Figura 22-B).

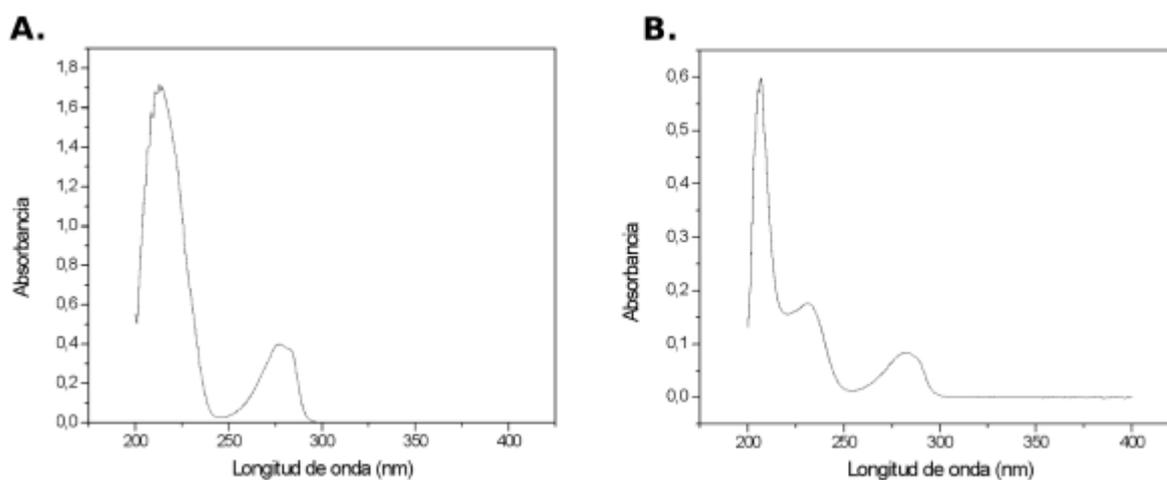


Figura 22. Espectros UV. **A.** Timol y derivados. **B.** Eugenol y derivados.

3.3.2.5. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS)

En la sección 3.5.3 de este Capítulo se muestra el ión molecular o ión molecular positivo (+Na) de cada derivado sintetizado. Esta técnica permitió determinar la masa exacta de cada compuesto diseñado y sintetizado con la finalidad de asegurar la completa elucidación de los derivados del Mentol y Eugenol.

3.4. Conclusiones parciales

En este Capítulo se presentó la metodología utilizada para la síntesis de nuevos compuestos del Mentol, Timol y Eugenol con metanol, etanol, 1-propanol, isopropanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol y 1-octanol. Se sintetizaron 27 nuevos carbonatos: **1a-i**, **2a-i** y **3a-i** a través de una metodología de síntesis sencilla y económica, con óptimos rendimientos. Los derivados obtenidos fueron caracterizados inequívocamente por técnicas de RMN, FTIR, HRMS y UV.

3.5. Sección experimental

3.5.1. Materiales y equipos

Todos los productos químicos, reactivos y solventes utilizados son de grado analítico. El Mentol (**1**, pureza 99%, Sigma-Aldrich), Timol (**2**, pureza 99%, Sigma-Aldrich), Eugenol (**3**, pureza 99%, Sigma-Aldrich) y el 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, pureza $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich) se utilizaron sin purificar. El diclorometano (CH_2Cl_2) se destiló y se secó sobre tamices moleculares de 4 Å. Todos los reactivos sólidos se secaron durante varias horas a alto vacío. La CCF se realizó en placas de gel de sílice Merck Sil G/UV254 con indicadores fluorescentes. Las placas cromatográficas se observaron con luz UV a 254 nm. Para el Mentol y sus derivados (**1a-i**) se utilizó como revelador al *p*-anisaldehído en el seguimiento de la reacción por CCF.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) se registraron en un espectrómetro Bruker Advance II 400 (400 MHz) usando cloroformo deuterado como solvente. Los corrimientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm). Las abreviaturas de los patrones de división son las siguientes: s=singlete, d=doblete, t=tripleto y m=múltiple. Todos los espectros de RMN- ^{13}C fueron desacoplados por protones. Se realizaron también espectros de correlación bidimensionales COSY (^1H - ^1H), HSQC y HMBC (^{13}C - ^1H). Los espectros de UV se realizaron en un espectrofotómetro Analytik Jena Modelo Specord S600 (Nº de serie: 212C348) empleando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. Los espectro FTIR se realizaron en un espectrofotómetro FTIR Agilent Cary 630. Las mediciones de HRMS se realizaron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo micrOTOF QII (QTOF; Bruker Daltonics).

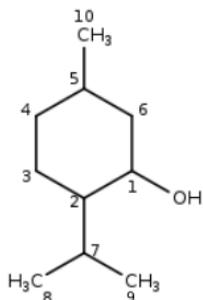
3.5.2. Método general de síntesis

A una solución de Mentol (**1**), Timol (**2**) o Eugenol (**3**) (1 equivalente) se añadió 1,1'-carbonildiimidazol (CDI, 1,2 equivalente) bajo agitación magnética a temperatura ambiente y bajo la corriente de N_2 en diclorometano (CH_2Cl_2). El progreso de la reacción se siguió mediante CCF, utilizando como sistema de solvente hexano:acetato de etilo (6:4). Una vez que **1**, **2** o **3** se convierte cuantitativamente en el intermediario Mentol-CI, Timol-CI o Eugenol-CI (respectivamente), se agregó *in situ* el alcohol correspondiente (3 equivalente) manteniendo las condiciones de reacción anteriormente mencionadas. El curso de la reacción

se monitorea por CCF, utilizando el sistema de solventes antes mencionado. Al cabo de 3 h se observó una conversión total del intermediario, formándose el correspondiente carbonato. Se realizaron extracciones con agua (3x20 mL), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el solvente se evaporó empleando un evaporador rotatorio [15].

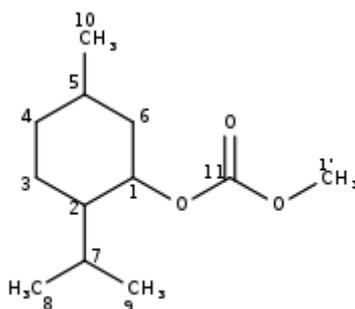
3.5.3. Caracterización de los nuevos derivados.

2-isopropil-5-metilciclohexanol (Mentol, 1).



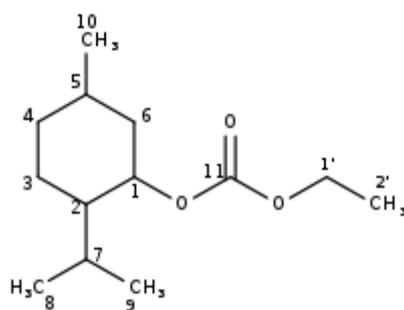
RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 3,40 (m, 1H, H-1), 2,6 (m, 1H, H-7), 1,97-1,10 (m, 9H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7), 0,9-0,8 (m, 9H, H-8, H-9, H-10). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 71,6 (C-1), 50,2 (C-2), 45,1 (C-6), 34,5 (C-4), 31,6 (C-5), 25,8 (C-7), 23,2 (C-3), 22,2 (C-10), 21,0 (C-9), 16,1 (C-8). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 3245,3 (OH). **HRMS m/z** calculado para C₁₀H₂₀O [M-H]⁺ 156,1514, hallado: 156,1655.

Metil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1a).



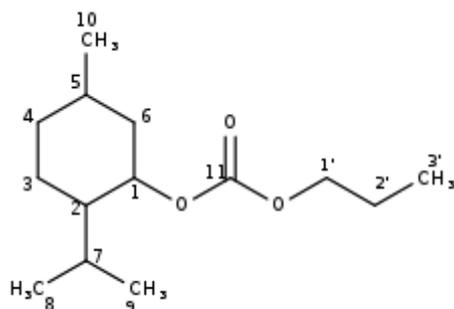
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,85 (m, 1H, H-1), 4,13 (s, 3H, H-1'), 2,13-1,20 (m, 9H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7), 0,91-0,76 (m, 9H, H-8, H-9, H-10). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,8 (C-11), 91,4 (C-1), 54,6 (C-1'), 47,0 (C-2), 44,4 (C-6), 33,6 (C-4), 31,6 (C-5), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,7 (C-10), 20,9 (C-9), 16,3 (C-8). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1753,0 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₂H₂₂O₃ [M-H]⁺ 215,1568, hallado: 215,1424.

Etil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1b).



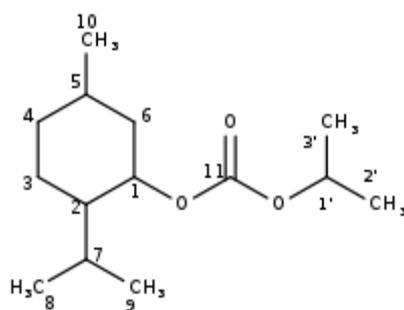
Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,81 (m, 1H, H-1), 4,41 (m, 2H, H-1'), 2,09-1,07 (m, 12H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2'), 0,87-0,72 (m, 9H, H-8, H-9, H-10). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,6 (C-11), 79,3 (C-1), 64,3 (C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 33,9 (C-4), 31,3 (C-5), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,8 (C-10), 16,4 (C-8, C-9), 14,0 (C-2'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1752,00 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₃H₂₄O₃ [M-Na]⁺ 251,1725 hallado: 251,1375.

Propil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1c).



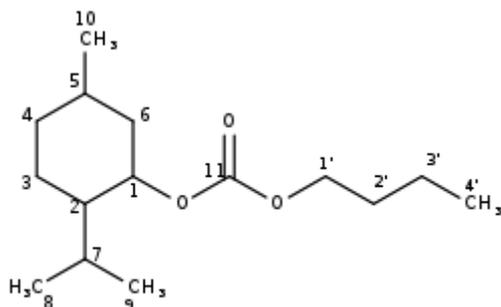
Rendimiento: 83%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,86 (m, 1H, H-1), 3,57 (m, 2H, H-1'), 2,14-1,12 (m, 11H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2'), 0,90-0,77 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,3 (C-11), 79,5 (C-1), 69,2 (C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 33,9 (C-4), 31,4 (C-5), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,8 (C-10), 20,6 (C-2'), 16,4 (C-8, C-9), 10,2 (C-3'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1752,00 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₄H₂₆O₃ [M-H]⁺ 243,1881, hallado: 243,3623.

Isopropil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1d).



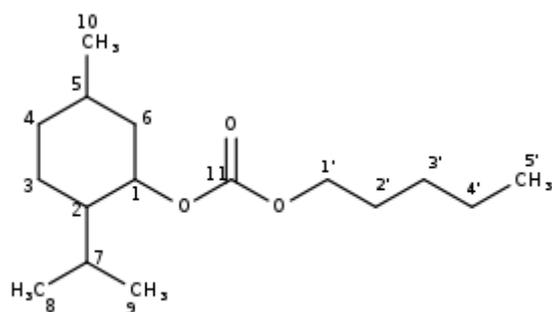
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 5,26 (m, 1H, H-1), 4,87 (m, 1H, H-1'), 1,89-1,50 (m, 15H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-3'), 0,93-0,78 (m, 9H, H-8, H-9, H-10). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,3 (C-11), 73,2 (C-1, C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 33,9 (C-4), 31,4 (C-5), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,8 (C-10), 20,6 (C-2, C-3'), 16,4 (C-8, C-9). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1752,00 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₄H₂₆O₃ [M-H]⁺242,1881, hallado: 242,1954.

Butil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1e).



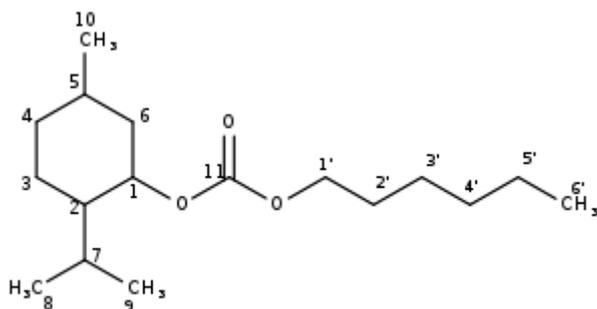
Rendimiento: 88%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,82 (m, 1H, H-1), 3,33 (m, 2H, H-1'), 2,11-1,18 (m, 13H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-3'), 0,87-0,74 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,2 (C-11), 79,4 (C-1), 71,0 (C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 33,9 (C-4), 31,4 (C-5), 29,7 (C-2'), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,8 (C-10), 20,6 (C-8, C-9, C-3'), 16,4 (C-4'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1743,56 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₆H₂₈O₃ [M-H]⁺ 257,2038, hallado: 257,3889.

Pentil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1f).



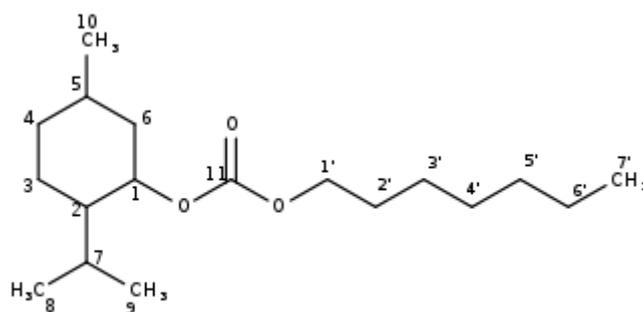
Rendimiento: 84%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,43 (m, 1H, H-1), 4,03 (m, 2H, H-1'), 2,14-1,25 (m, 15H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-'3, H-4'), 0,82-0,73 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-5'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,1 (C-11), 78,2 (C-1), 71,0 (C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 33,9 (C-4), 31,4 (C-5), 29,7 (C-2'), 26,5 (C-7), 23,5 (C-3), 21,8 (C-10), 20,6 (C-8, C-9, C-3'), 16,4 (C-4'), 14,0 (C-5'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1742,1 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₆H₃₀O₃ [M-H]⁺ 271,2194, hallado: 271,4156.

Hexil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1g).



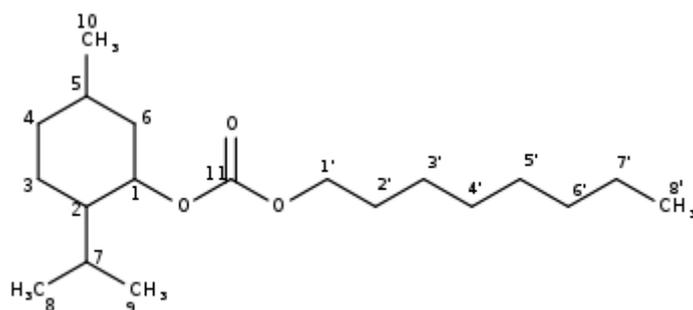
Rendimiento: 83%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 5,18 (m, 1H, H-1), 3,52 (m, 2H, H-1'), 2,07-1,19 (m, 17H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-'3, H-4', H-5'), 0,85-0,70 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-6'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,5 (C-11), 79,4 (C-1), 68,8 (C-1'), 46,9 (C-2), 40,5 (C-6), 33,8 (C-4), 31,5 (C-4'), 31,3 (C-5), 28,2 (C-2'), 25,5 (C-7), 25,2 (C-3'), 23,4 (C-3), 22,5 (C-5'), 21,7 (C-10), 20,4 (C-8, C-9), 16,3 (C-6'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1743,5 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₇H₃₂O₃ [M-Na]⁺ 307,2351, hallado: 307,2638.

Heptil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1h).



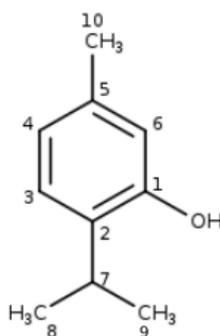
Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,41 (m, 1H, H-1), 3,61 (t, J=6,7 Hz, 2H, H-1'), 1,56-1,28 (m, 19H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 0,96-0,81 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-7'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 148,6 (C-11), 79,4 (C-1), 68,5 (C-1'), 47,0 (C-2), 40,5 (C-6), 34,0 (C-4), 32,7 (C-5'), 31,5 (C-5), 29,0 (C-2'), 28,8 (C-4'), 26,5 (C-3'), 25,7 (C-7), 23,5 (C-3), 22,5 (C-6'), 21,8 (C-10), 20,5 (C-8, C-9), 16,3 (C-6'), 14,0 (C-7'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1758,0 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₈H₃₄O₃ [M-Na]⁺ 320,9507, hallado: 320,2341.

Octil(2-isopropil-5-metilciclohexanol)carbonato (1i).



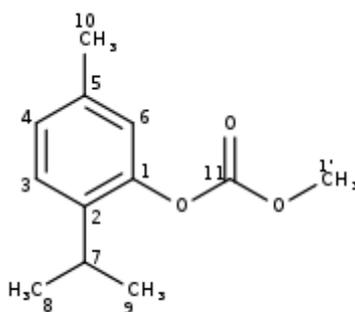
Rendimiento: 83%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 4,76 (m, 1H, H-1), 4,27 (m, 2H, H-1'), 2,04-1,14 (m, 21H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 0,80-0,67 (m, 12H, H-8, H-9, H-10, H-8'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,3 (C-11), 79,3 (C-1), 68,4 (C-1'), 46,9 (C-2), 40,4 (C-6), 33,8 (C-4), 32,7 (C-6'), 31,4 (C-5), 28,9 (C-4'), 28,3 (C-5'), 26,4 (C-3'), 25,7 (C-7), 23,4 (C-3), 22,4 (C-7'), 21,7 (C-10), 20,4 (C-8, C-9), 13,8 (C-8'). **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1743,0 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₉H₃₆O₃ [M-Na]⁺ 335,2664, hallado: 335,2549.

2-isopropil-5-metilfenol (Timol, 2).



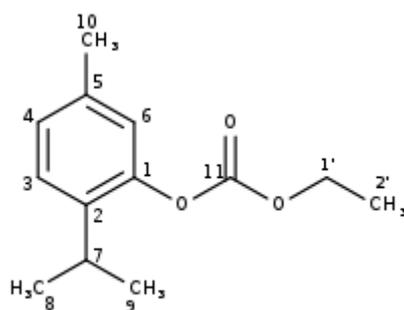
RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,08 (d, J= 7,77 Hz, 1H, H-3), 6,70 (d, J=7,68 Hz, 1H, H-4), 6,57 (s, 1H, H-6), 3,16 (m, J= 13,76 Hz, 1H, H-7), 2,27 (s, 3H, H-10), 1,23 (d, J=6,93 Hz, 6H, H-8, H-9). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 152,63 (C-1), 141,75 (C-5), 131,94 (C-2), 126,23 (C-3), 121,61 (C-4), 116,02 (C-1'), 26,75 (C-7), 22,65 (C-8, C-9), 20,82 (C-10). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 3175,84(OH).

Metil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2a).



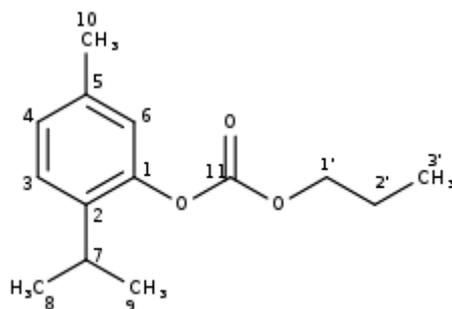
Rendimiento: 88%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,61 (m, 1H, H-6), 7,05-6,74 (m, 2H, H-3, H-4), 3,31 (sept, J= 13,80 Hz, 4H, H-7, H-1'), 2,21 (s, 3H, H-10), 1,23 (d, J= 6,92 Hz, 6H, H-8, H-9). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 154,1 (C-11), 147,0 (C-1), 137,5 (C-5), 136,9 (C-6), 132,4 (C-2), 126,1 (C-3), 121,7 (C-4), 54,8 (C-1'), 27,2 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 20,8 (C-10). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1771,17(OC(O)O).

Etil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2b).



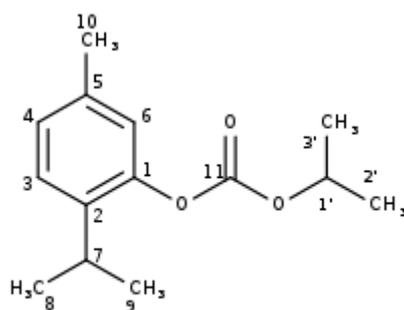
Rendimiento: 83%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,68 (s, 1H, H-6), 7,14-7,11 (m, 2H, H-3, H-4), 4,38 (quat., J= 13,8 Hz, 2H, H-1'), 3,36 (sept, J= 13,80 Hz, 1H, H-7), 2,28 (s, 3H, H-10), 1,29-1,27 (m, 9H, H-8, H-9, H-2'), **RMN-¹³C (101MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 154,4 (C-11), 148,2 (C-1), 137,4 (C-5), 135,1 (C-6), 131,0 (C-2), 126,9 (C-3), 122,1 (C-4), 64,5 (C-1'), 27,25 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 20,8 (C-10), 14,15 (C-2'). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1765,72 (OC(O)O).

Propil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2c).



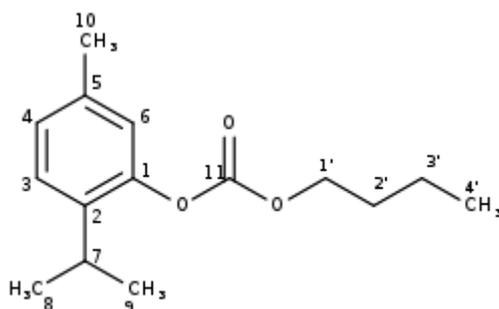
Rendimiento: 89%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,37 (s, 1H, H-6), 6,83-6,41 (m, 2H, H-3, H-4), 3,97 (t, J= 6,70 Hz, 2H, H-1'), 3,07 (sept, J=13,78 Hz, 1H, H-7), 1,97 (s, 3H, H-10), 1,53 (m, 2H, H-2'), 0,99-0,75 (d, J= 6,91 Hz, 9H, H-8, H-9, H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 154,21 (C-11), 148,3 (C-1), 136,2 (C-5), 135,0 (C-6), 132,3 (C-2), 126,05 (C-3), 121,7 (C-4), 70,5 (C-1'), 26,5 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 22,8 (C-2'), 21,1 (C-10), 20,1 (C-3'). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1769,57 (OC(O)O).

Isopropil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2d).



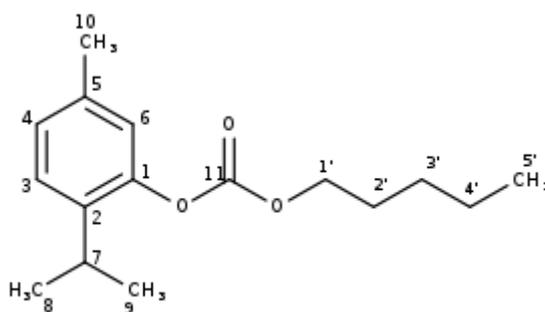
Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,69 (s, 1H, H-6), 7,11-7,09 (m, 2H, H-3, H-4), 6,72-6,70 (m, 1H, H-1'), 3,31 (sept, J= 13,79Hz, 1H, H-7), 2,25 (s, 3H, H-10), 1,26-1,24 (m, 12H, H-8, H-9, H-2', H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 154,7 (C-11), 152,7 (C-1), 136,0 (C-5), 135,15 (C-6), 132,3 (C-2), 126,6 (C-3), 122,0 (C-4), 73,2 (C-1'), 26,4 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 21,6 (C-2', C-3'), 20,7 (C-10). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1771,49 (OC(O)O).

Butil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2e).



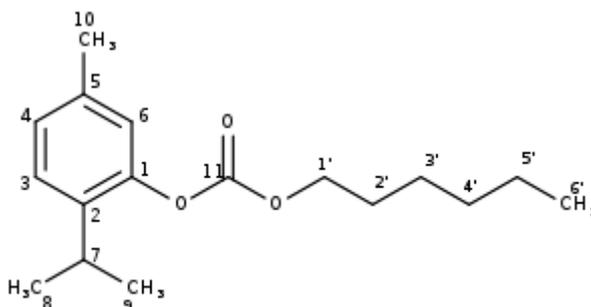
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,70 (s, 1H, H-6), 7,12-6,67 (m, 2H, H-3, H-4), 4,19-4,13 (t, J= 6,64 Hz, 2H, H-1'), 3,27-3,24 (sept, J=13,81 Hz, 1H, H-7), 2,25 (s, 3H, H-10), 1,25 (m, 10H, H-8, H-9, H-2', H-3'), 0,94-0,91 (m, 3H, H-4'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 154,45 (C-11), 153,05 (C-1), 136,15 (C-5), 135,0 (C-6), 132,4 (C-2), 126,0 (C-3), 121,7 (C-4), 68,5 (C-1'), 30,4 (C-2'), 26,5 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 21,1 (C-10), 19,0 (C-3'), 13,6 (C-4'). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1759,71 (OC(O)O).

Pentil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2f).



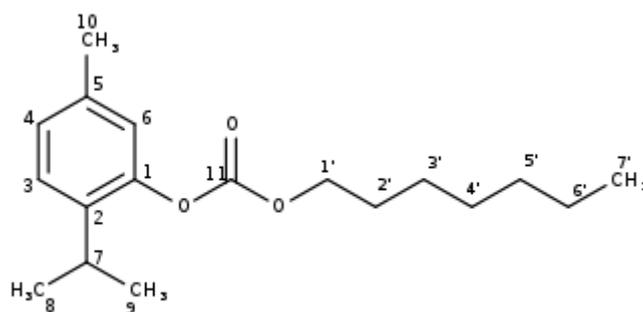
Rendimiento: 84%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,69 (s, 1H, H-6), 7,11 (m, 2H, H-3, H-4), 4,12 (t, J= 6,72 Hz, 2H, H-1'), 3,29-3,26 (sept, J=13,72 Hz, 1H, H-7), 2,24 (s, 3H, H-10), 1,67-1,65 (m, 2H, H-2'), 1,24 (m, 4H, H-3', H-4'), 1,22 (d, J= 6,91 Hz, 6H, H-8, H-9), 0,92 (m, 3H, H-5'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,7 (C-11), 154,3 (C-1), 136,3 (C-5), 135,1 (C-6), 132,4 (C-2), 126,15 (C-3), 121,9 (C-4), 68,25 (C-1'), 28,5 (C-2') 28,0 (C-3'), 26,6 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 22,4 (C-4'), 21,1 (C-10), 14,0 (C-5'). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1759,94 (OC(O)O).

Hexil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2g).



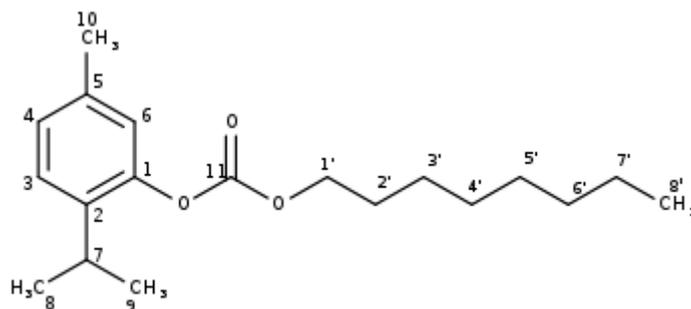
Rendimiento: 84%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,70 (s, 1H, H-6), 7,11-6,67 (m, 2H, H-3, H-4), 4,13 (t, J= 6,72 Hz, 2H, H-1'), 3,27 (sept, J= 13,72 Hz, 1H, H-7), 2,25 (s, 3H, H-10), 1,67 (m, 2H, H-2'), 1,38-1,23 (m, 12H, H-8, H-9, H-3', H-4', H-5'), 0,89 (m, 3H, H-6'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,6 (C-11), 153,6 (C-1), 136,3 (C-5), 135,0 (C-6), 132,0 (C-2), 126,1 (C-3), 120,8 (C-4), 68,1 (C-1'), 31,4 (C-4'), 29,0 (C-2') 25,4 (C-3'), 26,6 (C-7), 22,8 (C-8, C-9), 21,0 (C-10), 16,1 (C-5'), 14,0 (C-6'). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1761,84 (OC(O)O).

Heptil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2h).



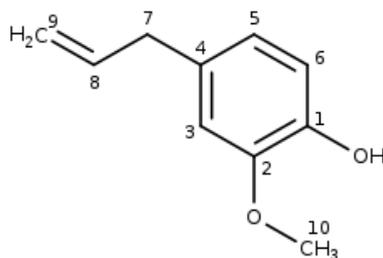
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,69 (s, 1H, H-6), 7,12-6,68 (m, 2H, H-3, H-4), 4,13 (t, J=6,68 Hz, 2H, H-1'), 3,27 (sept, J=13,70 Hz, 1H, H-7), 2,25 (s, 3H, H-10), 1,69-1,66 (m, 2H, H-2'), 1,25-1,23 (m, 14H, H-8, H-9, H-3', H-4', H-5', H-6'), 0,88 (m, 3H, H-7'), **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,7 (C-11), 153,6 (C-1), 136,4 (C-5), 135,0 (C-6), 132,0 (C-2), 126,2 (C-3), 121,1 (C-4), 68,3 (C-1'), 32,0 (C-5'), 29,0 (C-4'), 28,8 (C-2') 26,7 (C-3'), 25,8 (C-7), 23,0 (C-8, C-9), 22,9 (C-6'), 21,1 (C-10), 14,2 (C-7). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1761,65 (OC(O)O).

Octil(2-isopropil-5-metilfenil)carbonato (2i).



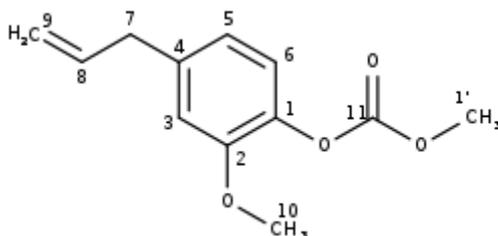
Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,64 (s, 1H, H-6), 7,07-6,70 (m, 2H, H-3, H-4), 4,14 (t, J= 6,64 Hz, 2H, H-1'), 3,32 (sept, J= 13,60Hz, 1H, H-7), 2,24 (s, 3H, H-10), 1,67 (m, 2H, H-2'), 1,53-1,21 (m, 16H, H-8, H-9, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 0,89 (m, 3H, H-8'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,6 (C-11), 154,1 (C-1), 136,2 (C-5), 135,0 (C-6), 132,3 (C-2), 126,1 (C-3), 121,7 (C-4), 68,2 (C-1'), 31,8 (C-6'), 28,8 (C-2'), 26,6 (C-7), 25,8 (C-3') 23,0 (C-8, C-9), 22,9 (C-4', C-5'), 21,0 (C-10), 18,3 (C-7'), 14,1 (C-8). **UV (CHOH)/nm max:** 277,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1742,1(OC(O)O).

4-Alil-2-metoxifenol (Eugenol, 3).



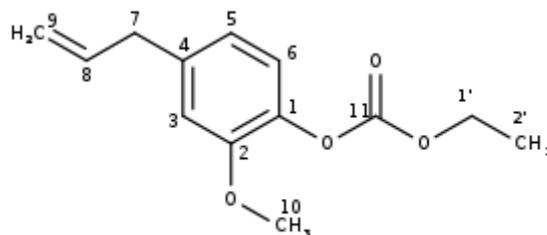
RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm): 7,05 (m, 1H, H-6), 6,90 (m, 2H, H-3, H-5), 6,16 (m, 1H, H-8), 5,27 (m, 2H, H-9), 4,07 (s, 3H, H-10), 3,54-3,52 (d, J=6,6 Hz, 2H, H-7). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 146,6 (C-2), 144,0 (C-1), 137,9 (C-8), 132,0 (C-4), 121,3 (C-5), 115,6 (C-9), 114,4 (C-6), 111,3 (C-3), 56,0 (C-10), 40,0 (C-7). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 3511,4 (OH). **HRMS (m/z)** calculado para C_{ad}H₁₂O₂ [M-H]⁺ 164,0837, hallado: 164,0765.

Metil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3a).



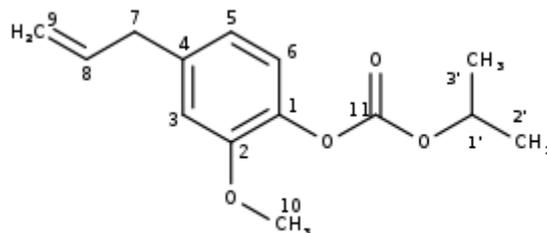
Rendimiento: 84%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,14-7,08 (m, 2H, H-5, H-6), 6,87-6,80 (m, 1H, H-3), 5,94 (m, 1H, H-8), 5,10 (m, 2H, H-9), 3,83-3,80 (m, 6H, H-10, H-1'), 3,40 (m, 2H, H-7). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,7 (C-11), 147,3 (C-1), 146,9 (C-2), 137,0 (C-4, C-7), 120,8 (C-5), 115,0 (C-9), 113,0 (C-3, C-6), 55,8 (C-10, C-1'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1773,7 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₂H₁₄O₄ [M-H]⁺ 222,0892, hallado: 222,0819.

Etil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3b).



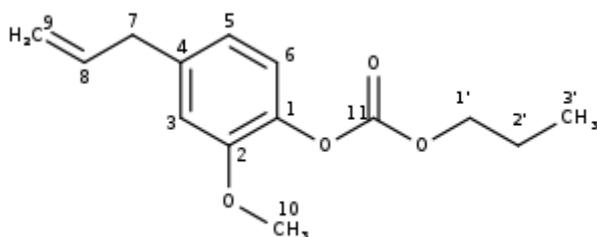
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,18-7,10 (m, 2H, H-5, H-6), 6,89 (m, 1H, H-3), 6,04-5,90 (m, 1H, H-8), 5,14 (m, 2H, H-9), 4,52-4,50 (m, 2H, H-1'), 3,90-3,85 (s, 3H, H-10), 3,45 (m, 2H, H-7), 1,49-4,45 (t, J=7,1 Hz, 3H, H-2'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,7 (C-11), 148,6 (C-1), 148,9 (C-2), 137,6 (C-4, C-8), 120,7 (C-5), 115,4 (C-9), 113,0 (C-3), 112,9 (C-6), 64,5 (C-1'), 55,9 (C-10), 40,0 (C-7), 14,1 (C-2'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1773,1 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₃H₁₆O₄ [M-Na]⁺ 259,1048, hallado: 259,1078.

Propil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3c).



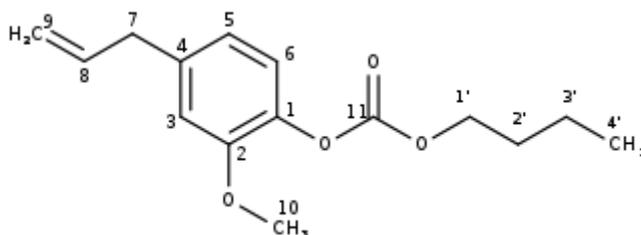
Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,14-7,07 (m, 1H, H-6), 6,88 (m, 1H, H-5), 6,68 (m, 1H, H-3), 6,0-5,92 (m, 1H, H-8), 5,11 (m, 2H, H-9), 4,38 (m, 2H, H-1'), 3,83 (s, 3H, H-10), 3,42-3,40 (m, 2H, H-7), 1,83-1,82 (m, 2H, H-2'), 1,03 (m, 3H, H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,8 (C-11), 140,5 (C-1, C-2), 137,2 (C-4, C-8), 120,9 (C-5), 116,6 (C-9), 113,1 (C-3, C-6), 70,0 (C-1'), 56,0 (C-10), 40,2 (C-7), 22,1 (C-2'), 10,4 (C-3'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1763,17 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₄H₁₈O₄ [M-Na]⁺ 273,1205, hallado: 273,1097.

Isopropil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3d).



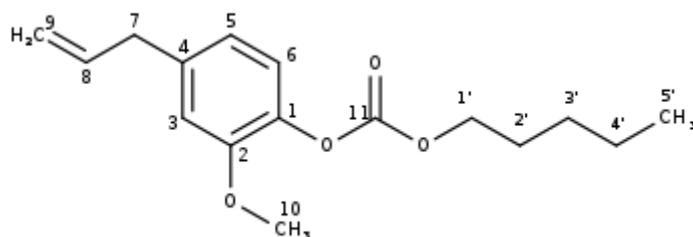
Rendimiento: 85%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,64 (m, 2H, H-5, H-6), 6,60 (m, 1H, H-3), 5,96-5,94 (m, 1H, H-8), 5,27-5,02 (m, 3H, H-9, H-1'), 3,84-3,82 (s, 3H, H-10), 3,41-3,29 (m, 2H, H-7), 1,42 (d, J= 6,3 Hz, 6H, H-2', H-3'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,6 (C-11), 148,1 (C-1), 147,0 (C-2), 137,0 (C-4, C-8), 120,6 (C-5), 114,7 (C-9), 113,0 (C-3), 111,5 (C-6), 73,2 (C-1'), 55,8 (C-10), 40,0 (C-7), 21,4 (C-2', C-3'), **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1774,2 cm⁻¹ (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₄H₁₈O₄ [M-Na]⁺ 273,1205, hallado: 273,1097.

Butil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3e).



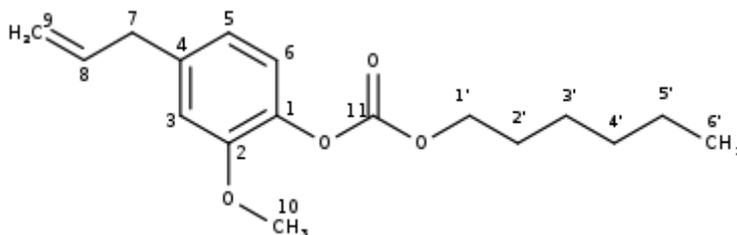
Rendimiento: 82%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,08 (m, 2H, H-5, H-6), 6,69 (m, 1H, H-3), 5,96-5,91 (m, 1H, H-8), 5,09-5,03 (m, 2H, H-9), 4,41 (t, J=6,64 Hz, 2H H-1'), 3,86 (s, 3H, H-10), 3,32-3,30 (d, J= 6,68 Hz, 2H, H-7), 1,79-1,75 (m, 2H, H-2'), 1,47-1,43 (m, 2H, H-3'), 0,98 (m, 3H, H-4'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 153,7 (C-11), 150,6 (C-1), 147,0 (C-2), 137,9 (C-8), 137,0 (C-4), 121,0 (C-5), 114,7 (C-9), 112,8 (C-3), 111,5 (C-6), 68,7 (C-1'), 55,8 (C-10), 39,8 (C-7), 30,4 (C-2'), 18,9 (C-3'), 13,6 (C-4'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1760,6 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₅H₂₀O₄ [M-Na]⁺ 287,1361, hallado: 287,1258.

Pentil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3f).



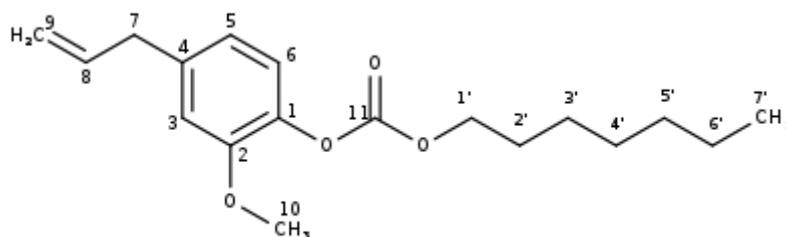
Rendimiento: 87%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,11-6,75 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 6,03-5,97 (m, 1H, H-8), 5,1 (m, 2H, H-9), 4,18 (t, J=6,72 Hz, 2H H-1'), 3,87 (s, 3H, H-10), 3,37-3,35 (d, J= 6,68 Hz, 2H, H-7), 1,72-1,70 (m, 2H, H-2'), 1,04 (m, 4H, H-3', H-4'), 0,95 (m, 3H, H-5'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 155,5 (C-11), 147,4 (C-1), 144,6 (C-2), 137,9 (C-8, C-4) 121,6 (C-5), 115,4 (C-9), 111,5 (C-3, C-6), 68,1 (C-1'), 55,8 (C-10), 39,8 (C-7), 28,4 (C-2'), 27,8 (C-3'), 22,3 (C-4'), 13,9 (C-5'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1761,9 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₆H₂₂O₄ [M-Na]⁺ 301,1518, hallado: 301,1430.

Hexil(4-Alil-2-metoxifenol)carbonato (3g).



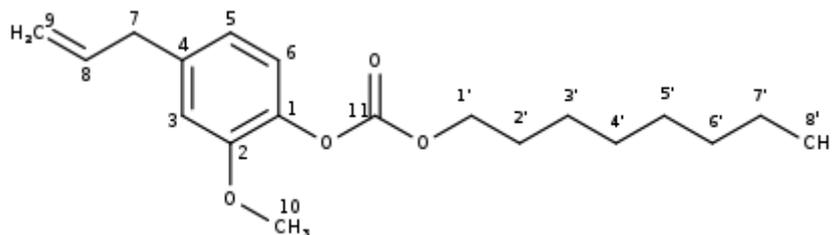
Rendimiento: 82%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,09-7,00 (m, 1H, H-6), 6,82 (m, 1H, H-5), 6,64 (m, 1H, H-3), 5,92 (m, 1H, H-8), 5,24 (m, 2H, H-9), 4,37 (t, J=6,71 Hz, 2H, H-1'), 3,78 (s, 3H, H-10) 3,58 (d, J=6,70 Hz, 2H, H-7), 1,52-1,26 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 0,85 (m, 3H, H-6'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,6 (C-11), 148,6 (C-1), 144,4 (C-2), 137,6 (C-8), 137,0 (C-4), 121,9 (C-5), 114,7 (C-9), 112,9 (C-3), 111,5 (C-6), 68,6 (C-1'), 55,8 (C-10), 40,0 (C-7), 32,7 (C-4'), 28,4 (C-2'), 25,5 (C-3'), 22,6 (C-5'), 14,0 (C-6'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1762,2(OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₇H₂₄O₄ [M-Na]⁺ 315,1674, hallado: 315,1082.

Heptil(4-Alil-2-metoxifenol heptyl)carbonato (3h).



Rendimiento: 88%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,12-7,08 (m, 2H, H-5, H-6), 6,83 (m, 1H, H-3), 5,98-5,92 (m, 1H, H-8), 5,09 (m, 2H, H-9), 4,41-4,37 (t, J=6,71 Hz, 2H, H-1'), 3,81 (s, 3H, H-10) 3,40-3,38 (d, J=6,70 Hz, 2H, H-7), 1,56-1,26 (m, 8H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 0,86 (m, 3H, H-6'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 150,6 (C-11), 148,6 (C-1), 144,4 (C-2), 137,6 (C-8), 137,0 (C-4), 122,0 (C-5), 114,7 (C-9), 112,9 (C-3), 111,5 (C-6), 68,6 (C-1'), 55,8 (C-10), 40,0 (C-7), 32,7 (C-5'), 28,4 (C-2', C-4'), 25,5 (C-3'), 22,6 (C-6'), 14,0 (C-7'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1760,6 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₈H₂₆O₄ [M-Na]⁺ 329,1831, hallado: 329,1690.

Octil(4-Alil-2-metoxifenol octyl)carbonato (3i).



Rendimiento: 86%. **RMN-¹H (400 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 7,07 (m, 1H, H-6), 6,85-6,83 (m, 1H, H-5), 6,67 (m, 1H, H-3), 5,96-5,90 (m, 1H, H-8), 5,08-5,01 (m, 2H, H-9), 4,38 (t, J=6,7 Hz, 2H, H-1'), 3,82 (s, 3H, H-10), 3,30-3,28 (d, J= 6,7 Hz, 2H, H-7), 1,78-1,75 (m, 2H, H-2'), 1,26 (m, 10H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7'), 0,87 (m, 3H, H-8'). **RMN-¹³C (101 MHz, CHCl₃) δ (ppm):** 153,6 (C-11), 148,7 (C-1), 144,6 (C-2), 137,9 (C-8), 137,6 (C-4), 122,1 (C-5), 114,9 (C-9), 113,0 (C-3), 111,7 (C-6), 69,0 (C-1'), 55,8 (C-10), 40,0 (C-7), 31,7 (C-6'), 29,1 (C-4', C-5'), 28,4, (C-2'), 25,7 (C-3'), 22,6 (C-7'), 14,0 (C-8'). **UV (CHOH)/nm max:** 282,0 nm. **IR-FTIR (cm⁻¹):** 1760,9 (OC(O)O). **HRMS (m/z)** calculado para C₁₉H₂₈O₄ [M-Na]⁺ 343,1987, hallado: 343,1871.

3.6. Bibliografia

- [1] O. O. Grygorenko, D. M. Volochnyuk, S. V. Ryabukhin & D. B. Judd, "The symbiotic relationship between drug discovery and organic chemistry", *Chemistry-A European Journal*, vol. 26, no. 6, pp. 1196-1237, 2020.
- [2] J. D. Rajput, S. D. Bagul & R. S. Bendre, "Design, synthesis, biological screenings and docking simulations of novel carvacrol and thymol derivatives containing acetohydrazone linkage", *Research on Chemical Intermediates*, vol. 43, no. 8, pp. 4893-4906, 2017.
- [3] A. K. Ghosh, "Capturing the essence of organic synthesis: From bioactive natural products to designed molecules in today's medicine", *The Journal of organic chemistry*, vol. 75, no. 23, pp. 7967-7989, 2010.
- [4] N. Singh, S. Singh, S. Kohli, A. Singh, H. Asiki, G. Rathee, R. Chandra & E. A. Anderson, "Recent progress in the total synthesis of pyrrole-containing natural products (2011-2020)", *Organic Chemistry Frontiers*, 2021.
- [5] B. Z. Kurt, I. Gazioglu, A. Dag, R. E. Salmas, G. Kayık, S. Durdagi & F. Sonmez, "Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling study of novel mentholcarbamate-substituted thymol/carvacrol derivatives", *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 25, no. 4, pp. 1352-1363, 2017.
- [6] B. Z. Kurt, S. Durdagi, G. Celebi, R. E. Salmas & F. Sonmez, "Synthesis, anticholinesterase activity and molecular modeling studies of novel carvacrol-substituted amide derivatives", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019.
- [7] M. Zengin, H. Genc, P. Taslimi, A. Kestane, E. Guclu, A. Ogutlu, O. Karabay & I. Gulcin, "Novel thymol bearing oxypropanolamine derivatives as potent some metabolic enzyme inhibitors-their antidiabetic, anticholinergic and antibacterial potentials", *Bioorganic chemistry*, vol. 81, pp. 119-126, 2018.
- [8] M. Hümmer, S. Kara, A. Liese, I. Huth, J. Schrader & D. Holtmann, "Synthesis of (-)-menthol fatty acid esters in and from (-)-menthol and fatty acids-novel concept for lipase catalyzed esterification based on eutectic solvents", *Molecular Catalysis*, vol. 458, pp. 67-72, 2018.
- [9] S. Daryadel, U. Atmaca, P. Taslimi, İ. Gülçin & M. Çelik, "Novel sulfamate derivatives of menthol: Synthesis, characterization, and cholinesterases and carbonic anhydrase enzymes inhibition properties", *Archiv der pharmazie*, vol. 351, no. 11, p. 1800209, 2018.

- [10] E. Makuch, A. Nowak, A. Günther, R. Pelech, L. Kucharski, W. Duchnik & A. Klimowicz, “Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of Eugenol by the esterification of Eugenol to new derivatives”, *AMB Express*, vol. 10, no. 1, pp. 1-15, 2020.
- [11] H. G. Bilgili, A. Kestane, P. Taslimi, O. Karabay, A. Bytyqi-Damoni, M. Zengin & I. Gulcin, “Novel Eugenol bearing oxypropanolamines: Synthesis, characterization, antibacterial, antidiabetic, and anticholinergic potentials”, *Bioorganic chemistry*, vol. 88, p. 102931, 2019.
- [12] Q. Q. Zhang, Z. Y. Sun, X. Y. Feng, R. J. Chen, W. Deng, Y. L. Tang, Z. Y. Guo, C. X. Liu, J. F. Chen & K. Zou, “Thymol derivatives from the roots of eupatorium chinense and their cytotoxic activities”, *Phytochemistry Letters*, vol. 29, pp. 165-168, 2019.
- [13] H. Yao, X. Lu, Z. Xin, X. Li, C. Chen & Y. Cao, “Two novel Eugenol-based difunctional benzoxazines: Synthesis and properties”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 616, p. 126209, 2021.
- [14] V. H. Staab, “New methods of preparative organic chemistry iv. Synthesis using heterocyclic amides (azolides)”, *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 1, no. 7, pp. 351-367, 1962.
- [15] S. Ravetti, M. S. Gualdesi, J. S. Trincherro-Hernández, G. Turk & M. C. Briñón, “Synthesis and anti-hiv activity of novel 2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine prodrugs”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 17, no. 17, pp. 6407-6413, 2009.
- [16] A. K. Ghosh & M. Brindisi, “Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 58, no. 7, pp. 2895-2940, 2015.
- [17] U. Salar, K. M. Khan, M. I. Fakhri, S. Hussain, S. Tauseef, S. Ameer, A. Wadood, H. Khan & S. Perveen, “1, 1'-carbonyldiimidazole (cdi) mediated facile synthesis, structural characterization, antimicrobial activity, and in-silico studies of coumarin-3-carboxamide derivatives”, *Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 1, pp. 86-101, 2018.
- [18] K. Kamiński, A. Rapacz, J. J. Luszczki, G. Latacz, J. Obniska, K. Kięc-Kononowicz & B. Filipek, “Design, synthesis & biological evaluation of new hybrid anticonvulsants derived from n-benzyl-2-(2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl) propanamide and 2-(2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl) butanamide derivatives”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 23, no. 10, pp. 2548-2561, 2015.

- [19] A. Ammazalorso, B. De Filippis, L. Giampietro & R. Amoroso, “N-acylsulfonamides: Synthetic routes and biological potential in medicinal chemistry”, *Chemical biology & drug design*, vol. 90, no. 6, pp. 1094-1105, 2017.
- [20] A. Chikkulapalli, S. K. Aavula, R. M. NP, C. Karthikeyan, V. K. CH, S. Sumathi, *et al.*, “Convenient n-acetylation of amines in n, n-dimethylacetamide with n, n-carbonyldiimidazole”, *Tetrahedron Letters*, vol. 56, no. 24, pp. 3799-3803, 2015.
- [21] R. Paul & G. W. Anderson, “N, n'-carbonyldiimidazole, a new peptide forming reagent1”, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 82, no. 17, pp. 4596-4600, 1960.
- [22] A. Armstrong, “N, n'-carbonyldiimidazole”, *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, 2007.
- [23] T. X. Métro, J. Martinez & F. Lamaty, “1, 1'-carbonyldiimidazole & mechanochemistry: A shining green combination”, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 5, no. 11, pp. 9599-9602, 2017.
- [24] C. M. Clemente, S. Ravetti, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, T. Pineda & S. M. Robledo, “Synthesis, in vitro antiprotozoal activity and cytotoxicity of new thymol carbonate derivatives”, *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 25, pp. 6597-6600, 2021.
- [25] C. M. Clemente, T. Pineda, L. M. Yepes, Y. Upegui, D. A. Allemandi, S. M. Robledo & S. Ravetti, “Eugenol carbonate activity against plasmodium falciparum, leishmania braziliensis, and trypanosoma cruzi”, *Archiv der Pharmazie*, vol. 355, no. 3, p. 2100432, 2022.
- [26] C. M. Clemente, S. M. Robledo & S. Ravetti, “Menthol carbonates as potent antiparasitic agents: synthesis and in vitro studies along with computer-aided approaches”, Preprint. Aceptado en *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022.

CAPÍTULO V

Estudios de estabilidad química

4.1. Consideraciones Generales

Un aspecto fundamental para el diseño de una nueva prodroga, es lograr una regeneración del principio activo con una velocidad y extensión adecuadas. La velocidad de regeneración debe ser idealmente completa, para no disminuir la biodisponibilidad del principio activo. El proceso de regeneración *in vivo* es el resultado de la hidrólisis química o enzimática del enlace covalente entre el fármaco y el complemento molecular [1-3].

Estudiar el perfil de estabilidad de una droga o prodroga es una etapa muy importante en el desarrollo de un producto farmacéutico. La información sobre el o los mecanismos de degradación que sufren es esencial para predecir cómo se comportará en diferentes situaciones, frente a cambios en el pH, temperatura, luz, entre otros. Esta información se determina mediante la realización de estudios de degradación, con los cuales se puede conocer la estabilidad de la droga ó prodroga y sus mecanismos de degradación [4]. A su vez, estos estudios permiten verificar qué compuestos diseñados como prodrogas tienen comportamiento como tal.

La organización internacional ICH (del inglés, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), emite guías para garantizar que los requisitos de registro de todas las farmacopeas nacionales sean intercambiables y establece que los estudios de estabilidad de una molécula nueva en la etapa de preformulación debe brindar información básica sobre la estabilidad física y química [5].

La Farmacopea Argentina establece que el estudio de estabilidad de una droga o prodroga está conformado por tres etapas (Figura 23) [6].



Figura 23. Esquema de las etapas de un estudio de estabilidad.

- En la primera etapa se realiza una degradación forzada, con el fin de obtener datos de los productos y mecanismos de descomposición de la droga o prodroga. Se somete la muestra a condiciones de estrés según los factores que pueden influir en la estabilidad de la muestra: temperatura, humedad, luz, diferentes pH. Este estudio permitirá seleccionar el método analítico adecuado para la cuantificación de la droga ó prodroga intacta y los productos de degradación.
- La segunda etapa se basa en la elección del método analítico. La validación del método para el seguimiento de la estabilidad es crucial debido a las posibles interferencias producidas por los productos de degradación, que generalmente tienen una estructura similar a la droga de origen. El método debe ser preciso, exacto, selectivo, lineal, reproducible y robusto.
- La tercera etapa consiste en un estudio de degradación acelerada, en el que se aumenta la velocidad de degradación de la sustancia en condiciones no extremas como en la degradación forzada, con el objeto de de estudiar y caracterizar parámetros fisicoquímicos de las drogas o prodrogas.

Dependiendo de los objetivos buscados, los ensayos de estabilidad pueden realizarse en diferentes condiciones o medios [7]. Los ensayos a diferentes valores de pH brindarán información sobre la estabilidad de la prodroga y de los posibles productos de degradación, determinando cómo afectará a la prodroga los diferentes pH del organismo [7]. Específicamente, es de interés conocer el comportamiento de los nuevos derivados en soluciones buffer simulando los pH's del estómago (pH 1,2), duodeno (pH 5,8) y plasma (pH 7,4), analizando el efecto del pH y de la concentración del buffer, a 37°C.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo general

Estudiar la estabilidad química de los nuevos compuestos en soluciones acuosas.

4.2.2. Objetivos específicos.

- Realizar una degradación forzada para conocer cuáles son los productos de degradación de las prodrogas sintetizadas.
- Desarrollar y validar cada metodología analítica de cuantificación seleccionada.
- Realizar una degradación acelerada para analizar el comportamiento de degradación de las prodrogas en los diferentes pH de estudio.

4.3. Resultados

4.3.1. Degradación forzada

Respetando las etapas de un estudio de estabilidad descritas anteriormente, en primer lugar, llevamos a cabo ensayos de degradación forzada con la finalidad de conocer cuál o cuáles serían los productos de degradación de los derivados sintetizados en los diferentes medios.

Debido a que la diferencia de cada derivado en una misma serie sólo difiere en la longitud del largo de la cadena alifática de cada alcohol, decidimos seleccionar por cada serie un único derivado de cadena alifática de longitud intermedia (**1e**, **2g** y **3e**). Los derivados seleccionados los analizamos en condiciones extremas de pH's (1,2 y 13) y a altas temperaturas (60°C).

Para el análisis correspondiente utilizamos Cromatografía Gaseosa (CG) para el derivado del Mentol (ausencia de grupos cromóforos), mientras que para los derivados de Timol y Eugenol la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) fue la técnica seleccionada.

En todos los casos, los derivados sufrieron hidrólisis dando origen al compuesto de partida correspondiente (Mentol, Timol o Eugenol), como único producto de degradación el cual fue estable en todas las condiciones analizadas. En virtud de que el comportamiento de los derivados en pH 1,2 y 13 fueron iguales, se muestra en la Figura 24 los cromatogramas obtenidos del análisis realizado en pH 1,2.

A raíz de que en el estudio de degradación forzada hallamos que los derivados se degradan dando origen únicamente a los compuestos de partida, decidimos validar al Mentol, Timol y Eugenol en los diferentes métodos analíticos seleccionados. Por este motivo, en las etapas posteriores sólo se analizará el porcentaje de recuperación del compuesto de partida y no el porcentaje de desaparición del derivado, simplificando la metodología del proceso analítico.

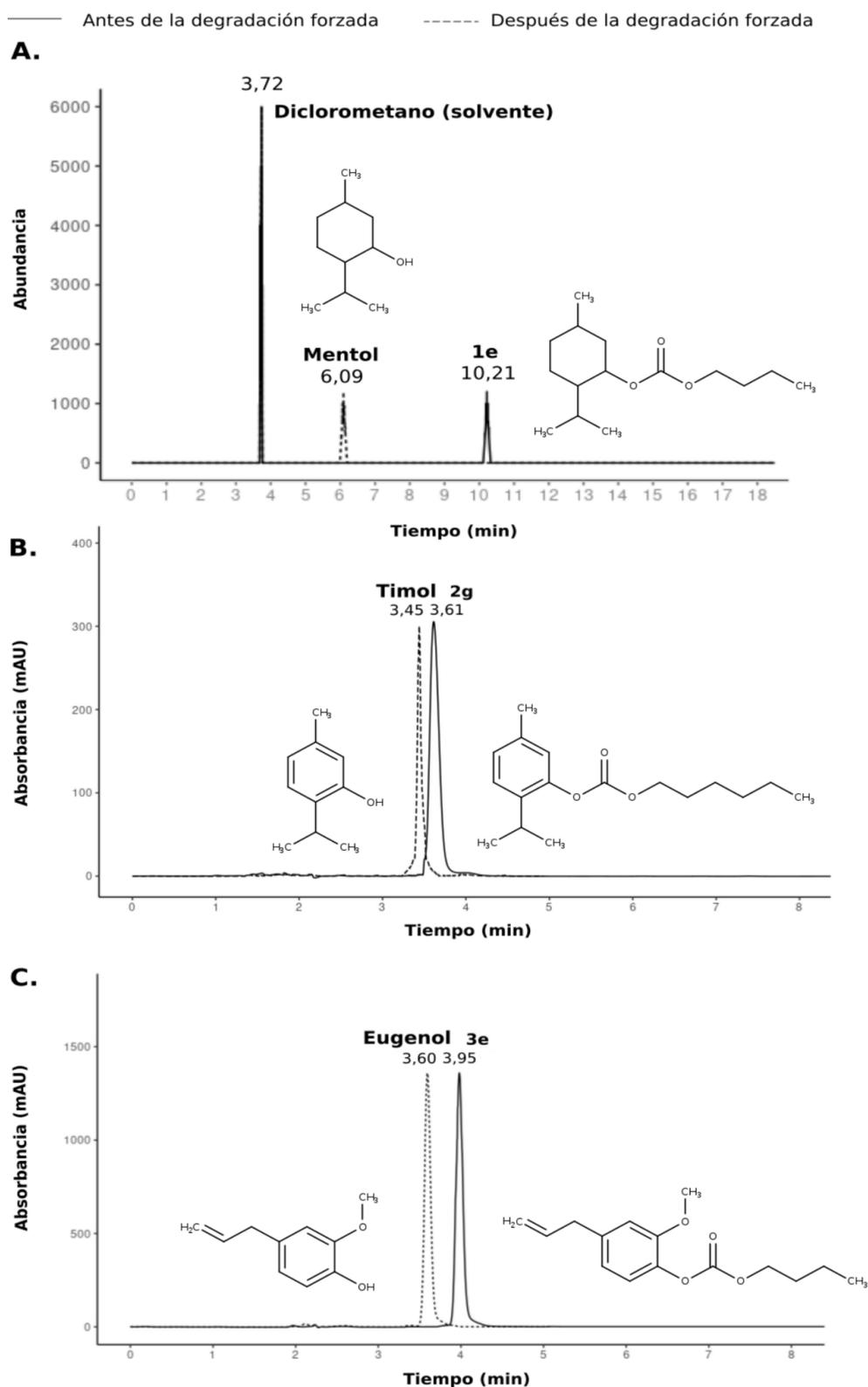


Figura 24. Cromatogramas de degradación forzada a pH 1,2 a 60°C antes y luego de 72 h. **A.** Cromatograma de GC del compuesto **1e**. **B.** Cromatograma de HPLC del compuesto **2g**. **C.** Cromatograma de HPLC del compuesto **3e**.

4.3.2. Selección y validación del método analítico

La validación del método analítico consiste en demostrar que el método seleccionado es confiable y adecuado para su propósito. En un estudio de validación deben considerarse los siguientes parámetros: selectividad, linealidad y calibración, precisión, exactitud y sensibilidad. Los métodos analíticos seleccionados GC para el Mentol y HPLC para el Timol y Eugenol, resultan herramientas analíticas integrales para la realización de estudios de estabilidad en compuestos orgánicos de bajo peso molecular, ya que permiten separar y cuantificar los componentes de una matriz con un sencillo o escaso tratamiento previo [8, 9].

4.3.2.1. Selectividad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de detectar en forma inequívoca al analito en presencia de otros componentes presentes en la matriz de la muestra. Dichos componentes pueden ser productos de degradación, subproductos o productos colaterales de la síntesis, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, entre otros.

En las Tablas 4-6 se detallan los tiempos de retención (t_r) para cada compuesto. Observamos una adecuada resolución entre cada derivado y el compuesto de partida, demostrando la selectividad del método seleccionado.

Tabla 4. Tiempos de retención (t_r) en CG del Mentol y sus derivados.

Compuestos	Mentol	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g	1h	1i
t_r (CG)	6,09	7,33	7,55	8,57	7,20	10,21	11,26	12,64	14,37	16,19

Tabla 5. Tiempos de retención (t_r) en HPLC del Timol y sus derivados.

Compuestos	Timol	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h	2i
t_r (HPLC)	3,45	3,51	3,55	3,54	3,56	3,58	3,59	3,61	3,63	3,65

Tabla 6. Tiempos de retención (t_r) en HPLC del Eugenol y sus derivados.

Compuestos	Eugenol	3a	3b	3c	3d	3e	3f	3g	3h	3i
t_r (HPLC)	3,60	3,71	3,75	3,83	3,89	3,95	4,00	4,12	4,29	4,32

4.3.2.2. Linealidad y Calibración

El propósito de esta prueba es demostrar que todo el sistema analítico muestra una respuesta lineal y es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. Así, la linealidad de un método analítico es la proporcionalidad entre la concentración del analito y la respuesta que se genera. Se establece el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede analizar una muestra por extrapolación en la curva estándar.

Para ello, se determinaron:

- Coeficiente de regresión lineal (r), para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto ($y = a x + b$);
- Pendiente (a), como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación entre diferentes métodos;
- Ordenada al origen (b), para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

El mejor indicador del modelo lineal no es r sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor t_r (ecuación 2), con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido (t_{tabla}), donde r corresponde al valor absoluto del coeficiente de regresión lineal y n es el número de medidas realizadas. Si el valor de t_r es mayor que t de la tabla se rechaza la hipótesis nula (no existe correlación entre x e y), siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada.

$$t_r = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad \text{ec. 2}$$

En la Tabla 7 se muestran, tanto las ecuaciones, como los datos de significancia estadística al graficar las áreas obtenidas en función de las concentraciones. Los datos para cada compuesto los obtuvimos por triplicado.

4.3.2.3. Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales, cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar (σ), estimada analíticamente como s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (**DER**), o coeficiente de variación (ecuación 3), donde (σ) corresponde a la desviación de las medidas y X es la media poblacional.

$$DER = \frac{100}{X} \quad \text{ec. 3}$$

La precisión debe medirse en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día e instrumento). El coeficiente repetitividad/reproducibilidad, es un parámetro muy útil para evaluar la precisión de un método analítico. El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) recomienda su determinación inyectando 6 veces una solución estándar, y que el valor de DER no debe ser superior a 2 [10].

La precisión la calculamos preparando dos soluciones de cada compuesto (concentraciones bajas y altas), efectuándose 6 inyecciones de cada una, y calculando luego las DER correspondientes a los dos valores mostrados en la Tabla 7.

4.3.2.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor experimental y el verdadero obtenido a partir de la curva de calibración a una concentración dada.

El porcentaje de recuperación es la forma más utilizada para expresarla. Si bien el valor verdadero de concentración no se conoce, sino que sólo se puede estimar, es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado (por pesada, dilución en peso, etc.) y utilizarla como referencia. Para ello, analizamos tres soluciones de cantidades

conocidas de cada compuesto correspondiente a concentraciones bajas, medias y altas. Determinamos el porcentaje de recuperación mediante la ecuación 4, donde el área esperada se ha calculado a partir de la curva de calibración. En la Tabla 7 se muestra la exactitud del método analítico para cada compuesto de partida, expresado como porcentaje de recuperación (%REC).

$$\% REC = \frac{\text{Área observada}}{\text{Área esperada}} \times 100 \quad \text{ec. 4}$$

4.3.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC). El primero corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra; mientras que el límite de cuantificación se refiere a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables, en las condiciones establecidas. Ambos parámetros se calcularon a partir de las tres concentraciones menores de la curva de calibrado para cada compuesto (ec.5 y ec.6). Los valores se presentan en la Tabla 7.

$$LD = \frac{Y_{blanco} + 3\sigma_{blanco}}{b(n')} \quad \text{ec. 5}$$

$$LC = \frac{Y_{blanco} + 10\sigma_{blanco}}{b(n')} \quad \text{ec. 6}$$

Tabla 7. Cifras de significancia estadística para las curvas de calibrado de Mentol (1), Timol (2) y Eugenol (3).

Compuestos	$y = ax + b$			Test estadístico ^a	Exactitud (% Recuperación)	Precisión (DER) ^b	LD ^c (mol/ml)	LC ^d (mol/ml)
	$a \pm (s t)$	$b \pm (s t)$	r					
Mentol (1)	$1,8 \times 10^4 \pm (1,8 \times 10^2)$	$0,07 \pm 0,01$	0,99	104,4	100,0; 102,7; 100,5	1,4; 3,7	$3,9 \times 10^{-6}$	$9,4 \times 10^{-3}$
Timol (2)	$3,7 \times 10^4 \pm (9,9 \times 10^2)$	$0,09 \pm 0,01$	0,99	37,4	102,0; 95,3; 100,2	1,7; 1,3	$7,3 \times 10^{-6}$	$9,2 \times 10^{-6}$
Eugenol (3)	$3,7 \times 10^4 \pm (5,9 \times 10^2)$	$0,09 \pm 0,01$	0,99	112,9	98,3; 99,6; 100,9	1,2; 1,3	$1,2 \times 10^{-5}$	$1,3 \times 10^{-5}$

^a t de Student para n-2 grado de libertad, t_{tabla} : 2,306.

^bDER: desviación estándar relativa.

^cLD: Límite de Detección

^dLC: Límite de Cuantificación

4.3.3. Degradación acelerada

Las reacciones de hidrólisis en soluciones acuosas, generalmente son dependientes del pH de la solución como consecuencia de procesos catalíticos, dando información sobre el mecanismo de reacción y la estabilidad de un compuesto [11]. Nuestro objetivo en esta etapa es obtener información acerca de las condiciones en las cuales se degradan los nuevos derivados, con el fin de obtener datos sobre el mecanismo de reacción y su estabilidad química.

Al tratarse de series homólogas se decidió seleccionar un solo derivado de cada serie, con la finalidad de someterlo a los estudios de estabilidad a diferentes valores de pH que simulan diferentes pH del organismo.

En primer lugar, realizamos estudios a valores de pH de 1,2; 5,8 y 7,4 con el objetivo de conocer las condiciones en las cuales se obtiene el compuesto de partida a partir de los derivados en función de cada medio, manteniendo constante otros factores como temperatura y fuerza iónica. Se eligió una temperatura de 37°C simulando la temperatura del organismo. Debido a que por bibliografía se halló que los carbonatos se hidrolizan en un período muy breve de tiempo [12], se decidió analizar la degradación a los 15 y 60 minutos.

Para el análisis de esta etapa se seleccionaron los derivados **1e**, **2g** y **3e** (mismos derivados seleccionados en la degradación forzada). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de recuperación del Mentol, Timol y Eugenol.

Compuestos	Recuperación del compuesto de partida (%)					
	15 min			60 min		
	pH 1,2	pH 5,8	pH 7,4	pH 1,2	pH 5,8	pH 7,4
Mentol	12	0	8	24	0	13
Timol	96	13	100	100	49	100
Eugenol	98	21	100	100	55	100

Del análisis realizado observamos que el derivado del Mentol es el más estable en todos los pH ensayados luego de los 60 min (Figura 25 A-C). En cambio, se observó que los carbonatos del Timol y Eugenol son inestables a pH 1,2 y 7,4; y relativamente estables a pH 5,8 luego de los 60 min (Figuras 26 A-C y Figura 27 A-C).

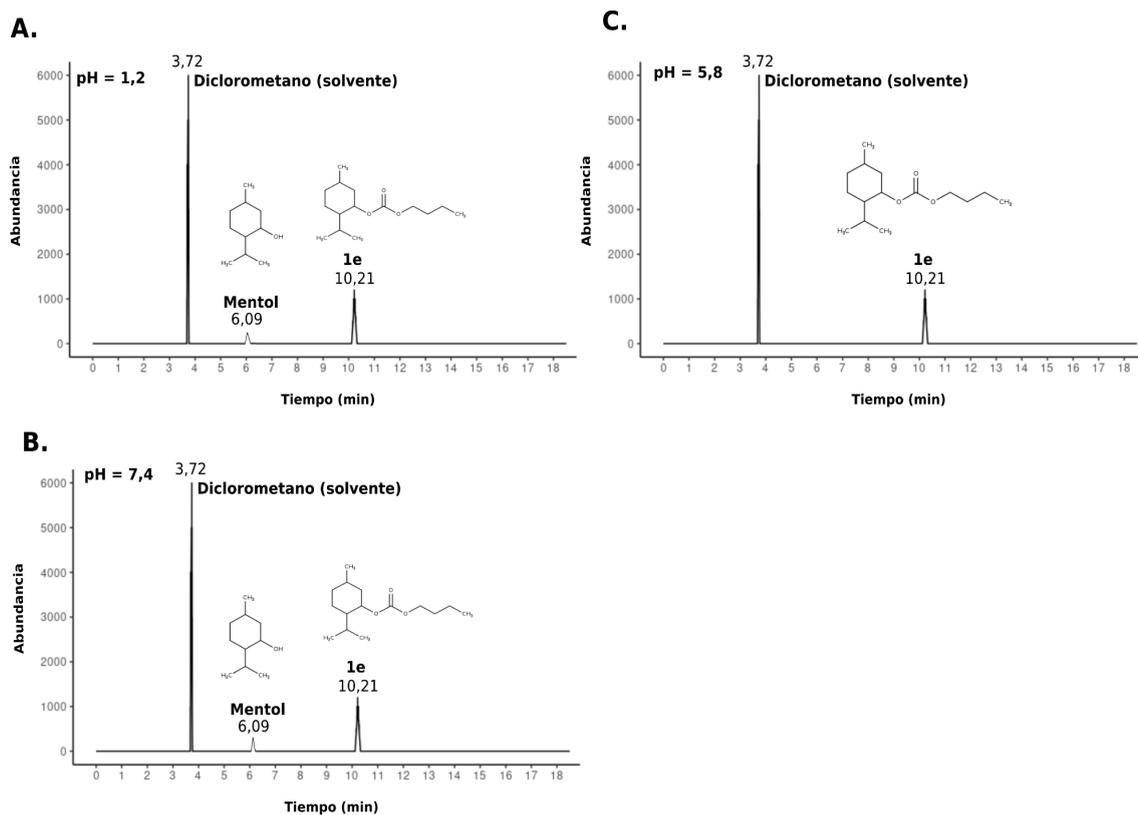


Figura 25. Cromatograma de gases de degradación acelerada de **1e** luego de 60 min. A. pH 1,2. B. pH 5,8. C. pH 7,4.

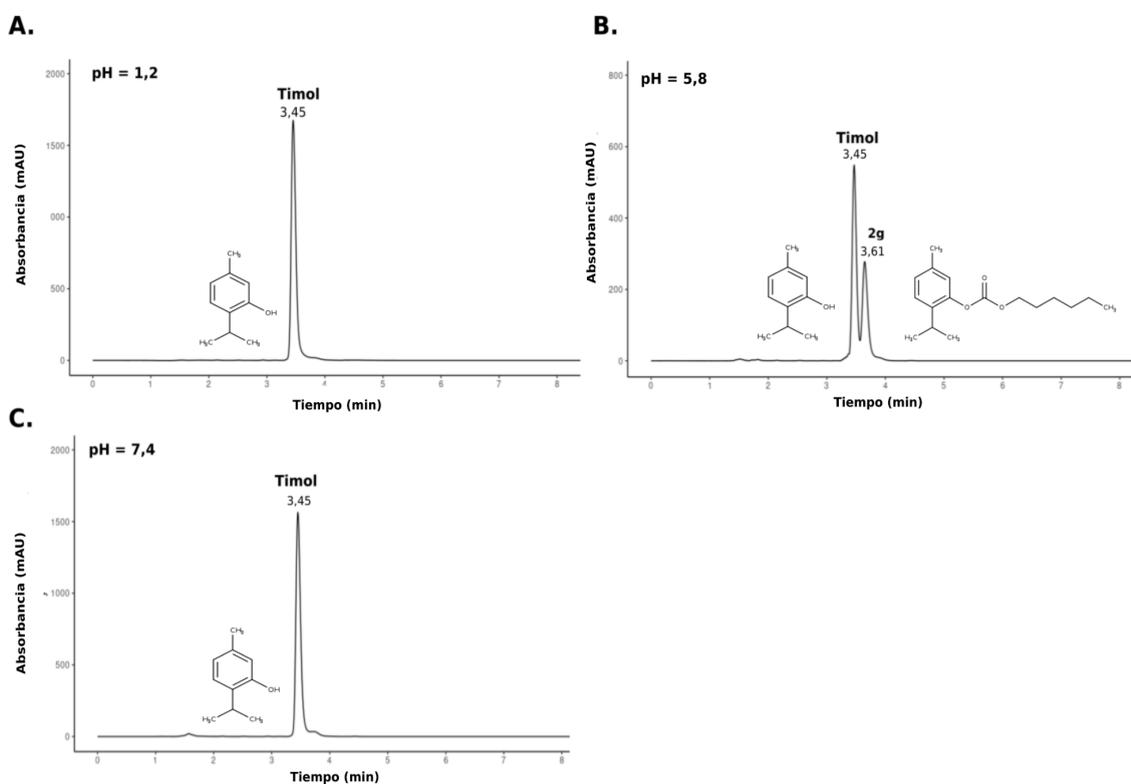


Figura 26. Cromatogramas de degradación acelerada de **2g** luego de 60 min. A. pH 1,2. B. pH 5,8. C. pH 7,4.

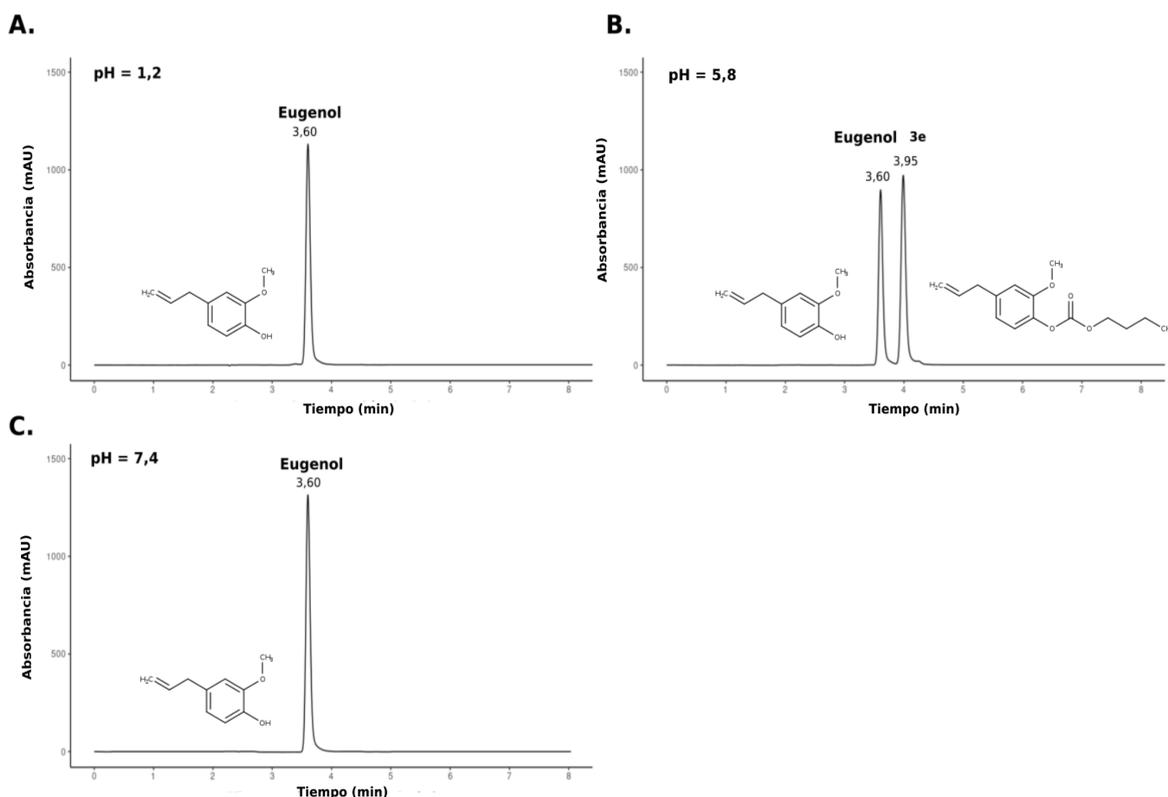


Figura 27. Cromatogramas de degradación acelerada de **3e** luego de 60 min. **A.** pH 1,2. **B.** pH 5,8. **C.** pH 7,4.

En segundo lugar, debido a que los derivados del Mentol mostraron ser estables luego de los 60 minutos ensayados, procedimos a realizar tomas de muestras a intervalos de tiempo mayores con la finalidad de conocer si los mismos poseen un comportamiento del tipo prodroga. A su vez, debido a su estabilidad, fue posible realizar estudios preliminares de cinética química

De los resultados obtenidos (Tabla 9 y Figura 28) determinamos que estos compuestos poseen una cinética de pseudo primer orden. Además, hallamos que el compuesto **1e** posee a pH 1,2 un $t_{1/2}$ de 1,7 h (99,0 min); mientras que en pH 5,8 y 7,4 poseen un $t_{1/2}$ de 99,0 y 69,3 h respectivamente.

Tabla 9. Estabilidad química de **1e** en soluciones acuosas a diferentes valores de pH's.

pH 1,2		pH 5,8		pH 7,4	
k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)	k (h ⁻¹)	t _{1/2} (h)
0,007	99,00	0,007	99,00	0,010	69,31

Las constantes de velocidad expresan una cinética de pseudo primer orden.

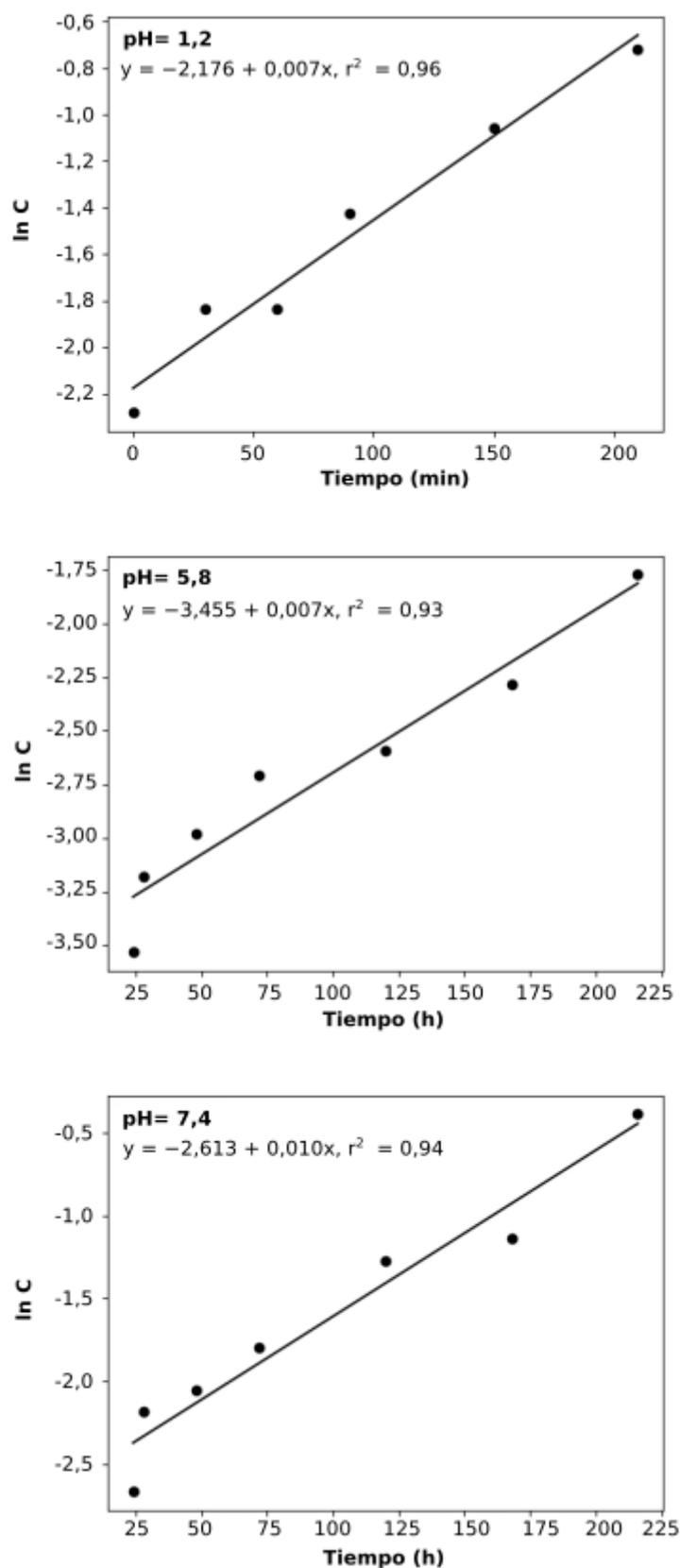


Figura 28. Cinética de degradación de pseudo primer orden de **1e** en soluciones acuosas a diferentes valores de pH's.

A raíz de los ensayos realizados observamos que los derivados carbonatos sufren hidrólisis tanto por mecanismos de catálisis ácidas o básicas, dando CO_2 y los correspondientes alcoholes como productos de degradación [13]. La reacción general de hidrólisis de las prodrogas transcurre de acuerdo a la Figura 29.

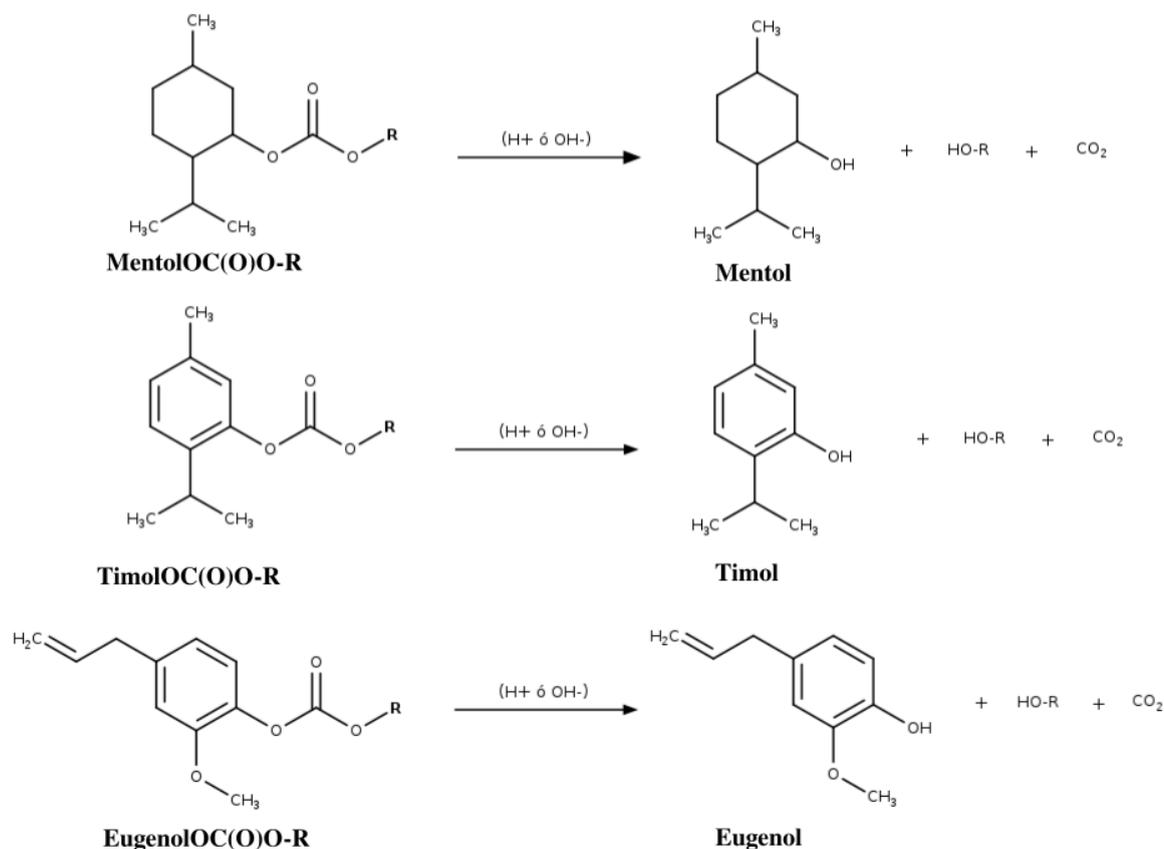


Figura 29. Reacción general de hidrólisis de los carbonatos de Mentol, Timol y Eugenol.

En una hidrólisis catalizada por ácido, se protona el oxígeno del grupo carbonilo, por lo que el carbono sp^2 se vuelve más sensible a un ataque nucleofílico por el agua, provocando la ruptura del enlace (Figura 30) [2]. En la hidrólisis básica, el hidroxilo (OH^-) actúa directamente como nucleófilo y ataca al carbono carbonílico siguiendo un mecanismo SN_2 (Figura 31) [2].

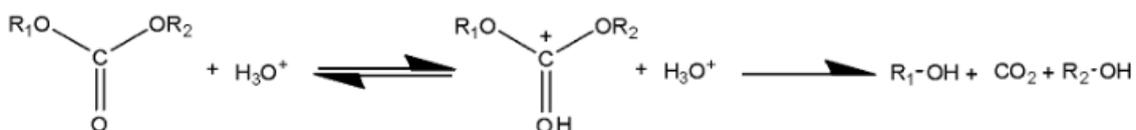


Figura 30. Mecanismo de hidrólisis catalizada por ácido.

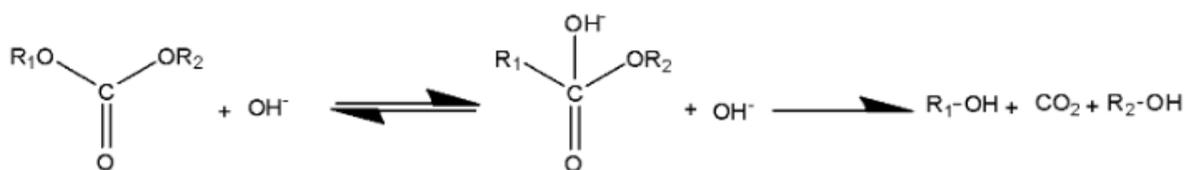


Figura 31. Mecanismo de hidrólisis catalizada por base.

4.4. Discusión

La hidrólisis es una de las reacciones más importantes que sufren las moléculas orgánicas en los medios acuosos. Muchas clases de compuestos orgánicos como los halogenuros de alquilo, ésteres, carbonatos, carbamatos, epóxidos, nitrilos, amidas, las aminas, entre otros, sufren hidrólisis en medio ácido, alcalino o neutro.

Los resultados obtenidos de la degradación forzada en este trabajo demostró que los derivados sintetizados se degradan a los compuestos de partida y no a otros productos de degradación, esto llevó a una simplificación de los ensayos de las dos etapas subsiguientes.

De los estudios de estabilidad acelerada observamos que todos los carbonatos resultaron ser más estables a pH 5,8. Dichos perfiles concuerdan con datos de estabilidad informados por otros autores. N'Da *et al.* desarrollaron una serie de prodrogas de Zidovudina con uniones carbonato, en un intento por mejorar las propiedades fisicoquímicas para la liberación transdérmica, disminuir los efectos secundarios y la toxicidad que se asocian a las altas dosis orales del fármaco. La estabilidad química de cada carbonato resultó sustancialmente mayor a pH 5,0 que a pH 7,4 [15]. Cabe destacar que las prodrogas de carbonatos se hidrolizan más rápidamente que las prodrogas de carbamatos y ésteres [16]. Este mismo comportamiento se observó cuando Dittert y colaboradores estudiaron la estabilidad química de compuestos carbamatos y carbonatos en diferentes medios acuosos [14].

Diversos autores han realizado prodrogas de unión ésteres de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, como por ejemplo Ibuprofeno y Ketoprofeno, con compuestos naturales como Mentol, Timol y Eugenol. En dichos estudios se observa que la degradación química, en medios ácidos y neutros, es siempre menor para los derivados del Mentol con respecto a los derivados del Timol y Eugenol [17, 18].

Estos hallazgos coinciden con lo que observamos en los resultados de los ensayos de degradación acelerada, donde hallamos que los carbonatos de Mentol, a diferencia de los

carbonatos de Timol y Eugenol, fueron más estables a los 60 min. Los derivados sintetizados del Timol y Eugenol a diferencia de los derivados del Mentol poseen un anillo aromático. La ausencia de un sistema de electrones deslocalizados en los derivados del Mentol genera una incapacidad del grupo hidroxilo de liberar su protón y esto podría ser el motivo en la diferencia en la estabilidad química observada. Asimismo, Erez y colaboradores confirman que la velocidad de hidrólisis del enlace de carbonato varía según la capacidad que posee la molécula de donar o aceptar electrones [19].

4.5. Conclusiones parciales

Los resultados de estabilidad química indicaron que todos los nuevos derivados son sensibles a la hidrólisis química, concluyendo así que estos compuestos tienen comportamiento de prodrogas.

El pH 5,8 resultó ser la condición más estable para todos los nuevos derivados ensayados. Los derivados del Mentol, en comparación con los derivados del Timol y Eugenol, resultaron ser más estables en todos los pH ensayados. A su vez, se logró identificar en el derivado **1e** una cinética de degradación de pseudo primer orden, cómo también, la determinación de su constante de velocidad y tiempo de vida media a los diferentes valores de pH ensayados.

Por consiguiente, concluimos que las nuevas series sintetizadas presentan un comportamiento de prodroga de unión temporal, ya que al producirse la ruptura de la molécula se regenera el compuesto de partida como único responsable de las actividades biológicas ensayadas a posterior.

4.6. Sección experimental

4.6.1. Materiales y equipos

Los prodrogas se sintetizaron de la forma descrita en el Capítulo IV. El buffer pH 1,2 (0,205 M) se preparó con cloruro de potasio (3,73 g/L) y ácido clorhídrico (162 mL, 0,2 M); el de pH 5,8 (0,025) se preparó con fosfato monoácido de potasio (0,68 g/L) y fosfato diácido de sodio dihidratado (8,42 g/L), el de pH 7,4 (0,025 M) se preparó con fosfato monoácido de potasio monobásico (0,67 g/L) y fosfato diácido de sodio dihidratado (3,56 g/L) y el de pH 13,0 (0,180 M) se preparó con hidróxido de sodio (5,19 g/L) y cloruro de potasio (3,67 g/mL), todos en agua MILI-Q de pH 6,1. El pH se determinó con un pHmetro Thermo (RL060P), el cual fue calibrado con soluciones estándares de buffer pH's 7,00 ($\pm 0,01$) y 4,01 ($\pm 0,01$).

Los experimentos de estabilidad química se realizaron en tubos de Khan con tapa, los que se sellaron con parafilm y se mantuvieron a la temperatura de trabajo en baños termostatzados. El metanol (MeOH) y el acetonitrilo (ACN) fueron de grado HPLC, y el diclorometano de grado analítico, todos de marca Sigma. El agua fue purificada usando un sistema de purificación Milli-Q (Millipor®), y la fase móvil fue filtrada en filtros Millipore® Tipo FH (4,5 µm) y desgasificada con vacío.

Las mediciones de HPLC fueron realizadas en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, con detector UV-Visible utilizando el software Dionex Chromeleon v.7.1.2 para la adquisición de datos. Equipado con una columna C₁₈ (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula: 5 µm, tamaño poro: 120 Å) marca Phenomenex LC. Las fases móviles estuvieron constituidas por ACN: MeOH: Agua (50:40:10). Las mediciones de CG fueron realizadas en un cromatógrafo Agilent 7890A, con una columna ZB-WAX (60 mm largo x 0,250 mm ancho x 0,25 µm film) y con un detector de ionizador de llama, el límite de temperatura establecido fue de 20 - 250 °C, se utilizó Helio como gas carrier y un flujo de 2,00 mL/min.

Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el programa StudioR para Linux. Las desviaciones se determinaron para un intervalo de confianza del 95%.

4.6.2. Estabilidad química

Las etapas de degradación forzada, validación del método analítico y degradación acelerada llevadas a cabo en este Capítulo fueron realizadas según los protocolos que establece la Farmacopea Argentina [6].

Para llevar a cabo los estudios preliminares de degradación forzada se sometieron a los derivados, sin detalle de concentración, a soluciones acuosas de pH's 1,2 y 13 a una temperatura de 60 °C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se analizaron por CG o HPLC, según correspondía. Para los estudios de degradación acelerada se prepararon soluciones madres de las prodrogas en diclorometano (5×10^{-5} mol/mL). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 10 µL de las soluciones madres y se agregó 990 µL de buffer a cada una, se taparon, se agitaron con un sonicador y se sellaron con parafilm. Se colocaron en un baño termostatzado, se extrajeron muestras a intervalos regulares de tiempo.

Para la cuantificación en HPLC, se tomaron 200 µL de cada solución y se le agregaron 300 µL de MeOH. Las prodrogas de Timol se analizaron a $\lambda=277$ nm y un caudal de 0,7 cm³/min;

las prodrogas de Eugenol a $\lambda=282$ nm y un caudal 1 cm³/min. Se utilizó la misma fase móvil para todos los compuestos. Para la cuantificación de las prodrogas del Mentol en CG, se le agregó a cada muestra un 1 mL de diclorometano, luego se extrajo la fase orgánica y se cuantificó.

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para una reacción de primer orden fue calculado según la ecuación 7:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k \quad \text{ec. 7}$$

4.7. Bibliografía

- [1] A. R. Gennaro, “Remington farmacia”, *Ed. Médica Panamericana*, 2003.
- [2] A. T. Florence & D. Attwood, “Drug Stability”, *Physicochemical Principles of Pharmacy*. 6 ed. Pharmaceutical press, 2016.
- [3] S. Gaisford & M. Saunders, “Essentials of pharmaceutical preformulation”, *John Wiley & Sons*, 2012.
- [4] S. Ahuja & S. Scypinski, “Handbook of modern pharmaceutical analysis”, *Academic press*, vol. 3, 2001.
- [5] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: ICH Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003.
- [6] ANMAT, Farmacopea Argentina 7° Ed., vol. I. Ministerio de Salud de la Nación, 2013.
- [7] R. M. Maggio, S. E. Vignaduzzo & T. S. Kaufman, “Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 49, pp. 57-70, 2013.
- [8] A. Boye, J. K. Addo, D. O. Acheampong, A. K. Thomford, E. Asante, R. E. Amoaning & D. N. Kuma, “The hydroxyl moiety on carbon one (c1) in the monoterpene nucleus of thymol is indispensable for anti-bacterial effect of thymol”, *Heliyon*, vol. 6, no. 3, p. e03492, 2020.

- [9] R. Samarasekera, I. S. Weerasinghe & K. P. Hemalal, "Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes", *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, vol. 64, no. 3, pp. 290-295, 2008.
- [10] U. Pharmacopeia, "31: General chapters, validation of compendial procedures", *United States Pharmacopeial Convention, Rockville*, pp. 683-7, 2008.
- [11] L. Gonzales & L. Barrantes, "Cinética química aplicada a los procesos de descomposición de los fármacos", *Editorial Universidad de Costa Rica*, 2004.
- [12] X. He, W. Lu, X. Jiang, J. Cai, X. Zhang & J. Ding, "Synthesis and biological evaluation of bis and monocarbonate prodrugs of 10-hydroxycamptothecins", *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 12, no. 15, pp. 4003-4008, 2004
- [13] M. S. Gualdesi, S. Ravetti, M. A. Raviolo & M. C. Briñón, "Preformulation studies of novel 5-o-carbonates of lamivudine with biological activity: solubility and stability assays", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 40, no. 9, pp. 1246-1252, 2014.
- [14] L. W. Dittert & T. Higuchi, "Rates of hydrolysis of carbamate and carbonate esters in alkaline solution", *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 52, no. 9, pp. 852-857, 1963.
- [15] D. D. N'Da & J. C. Breytenbach, "Synthesis of methoxypoly (ethylene glycol) carbonate prodrugs of zidovudine and penetration through human skin in vitro", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 61, no. 6, pp. 721-731, 2009.
- [16] L. Biasutto & M. Zoratti, "Prodrugs of quercetin and resveratrol: a strategy under development", *Current drug metabolism*, vol. 15, no. 1, pp. 77-95, 2014.
- [17] V. K. Redasani & S. B. Bari, "Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of ibuprofen with menthol, thymol and Eugenol", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 56, pp. 134-138, 2012.
- [18] B. Dhokchawle, S. Tauro & A. Bhandari, "Ester prodrugs of ketoprofen: Synthesis, hydrolysis kinetics and pharmacological evaluation", *Drug research*, vol. 66, no. 01, pp. 46-50, 2016.

[19] R. Erez, S. Ebner, B. Attali & D. Shabat, "Chemotherapeutic bone-targeted bisphosphonate prodrugs with hydrolytic mode of activation", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 18, no. 2, pp. 816-820, 2008.

CAPÍTULO VI

Estudios de permeabilidad a través de un modelo *in silico* e *in vitro*

Los estudios de permeabilidad se realizaron en colaboración con las Dras. Renée Onnainty y Gladys Granero de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET).

5.1. Consideraciones generales

Diversas moléculas orgánicas, como metabolitos, fármacos y xenobióticos, interactúan con las membranas celulares y producen modificaciones en sus propiedades. Muchas de ellas se trasladan a través de la bicapa lipídica utilizando diversos mecanismos de transporte activo y pasivo de la membrana. Existen sólidas pruebas experimentales de que las pequeñas moléculas lipofílicas, incluidos muchos fármacos comercializados, son capaces de atravesar bicapas lipídicas artificiales por difusión pasiva impulsada por el gradiente de concentración entre las soluciones en ambos lados de la bicapa [1].

En las membranas naturales, los mecanismos de permeabilidad selectiva son más complejos. Además de la difusión pasiva, hay afluencia y efluencia mediada por transportadores y compuestos específicos, transcitosis adsorptiva de compuestos catiónicos, endocitosis mediada por receptores, micropinocitosis y otros mecanismos [2-5]. La relevancia de la difusión pasiva y el transporte mediado por la afluencia y el flujo de compuestos relacionados con fármacos se ha debatido ampliamente [1,4,6-9] y se ha concluido que ambos mecanismos coexisten y contribuyen a la translocación a través de las membranas biológicas [1,6].

Durante el diseño de candidatos a fármacos prometedores, la optimización de su eficacia farmacológica suele realizarse en paralelo a la optimización de una farmacocinética favorable, es decir, absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

El coeficiente de permeabilidad determina la velocidad a la que los fármacos atraviesan las barreras de permeabilidad y por lo tanto influye en la administración y distribución de los

fármacos en las membranas biológicas, tales como las membranas de las células epiteliales de la barrera de la mucosa intestinal o las membranas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.

Con el creciente descubrimiento de nuevas entidades químicas farmacológicamente activas surgió la necesidad de utilizar métodos fiables para la rápida evaluación y predicción de dicha propiedad [10]. Las técnicas que se utilizan en la actualidad para predecir el coeficiente de permeabilidad de un fármaco pueden ser modelos *in vivo*, *ex vivo*, *in silico* o *in vitro* [11-15].

5.1.1. Difusión de fármacos a través de membranas biológicas

La membrana celular es una estructura anfipática, compuesta fundamentalmente por una bicapa lipídica y proteínas (Figura 32). Las principales clases de lípidos anfipáticos que la componen son: fosfolípidos, glucolípidos y esteroides. La proporción de cada uno depende del tipo de célula pero, en general, los fosfolípidos son los más abundantes, siendo la fosfatidilcolina un componente fundamental y el que se encuentra en mayor cantidad.

La disposición de los fosfolípidos en la bicapa lipídica (donde las colas apolares hidrofóbicas se encuentran hacia el interior de la membrana y las cabezas polares hidrofílicas hacia afuera) previene la difusión a través de la membrana de solutos polares tales como iones, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y, en general, permite la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas [16].

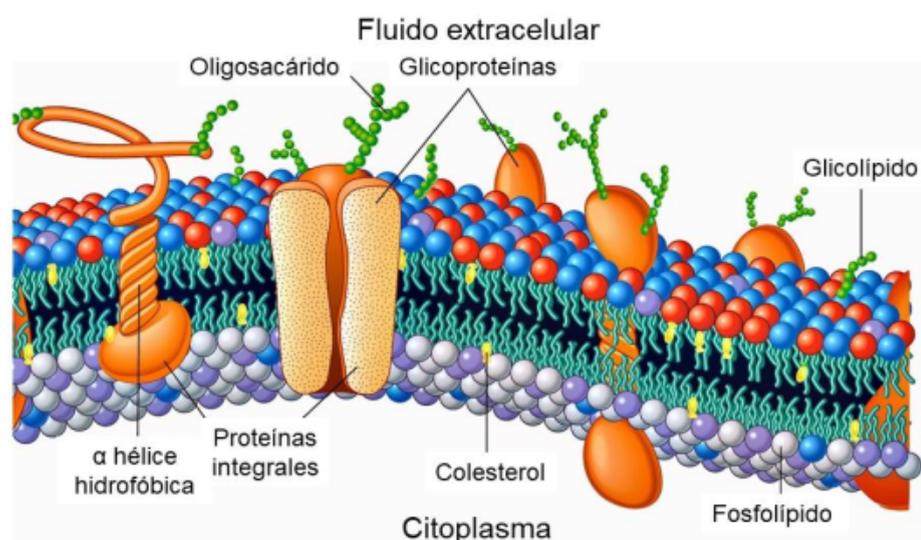


Figura 32. Estructura de la membrana celular.

Debido a dicha bicapa fosfolipídica y a las proteínas de membrana específicas, la membrana celular presenta una permeabilidad selectiva a diferentes moléculas mediante mecanismos de transporte pasivo y activo. Cuando el movimiento de sustancias a través de la membrana sucede por medio de un equilibrio químico o eléctrico y transcurre sin requerimientos de energía, se denomina transporte pasivo. El transporte pasivo puede darse por difusión debido a un gradiente de concentración (vía transcelular o paracelular) o mediante difusión facilitada (mediada por proteínas transportadoras). De lo contrario, cuando el transporte de sustancias se realiza en contra del gradiente químico o eléctrico y se requiere energía, se denomina transporte activo. Las células utilizan dos tipos de transporte activo que requieren energía (mediante el uso de ATP), ya sea en forma directa o indirecta (Figura 33) [17].

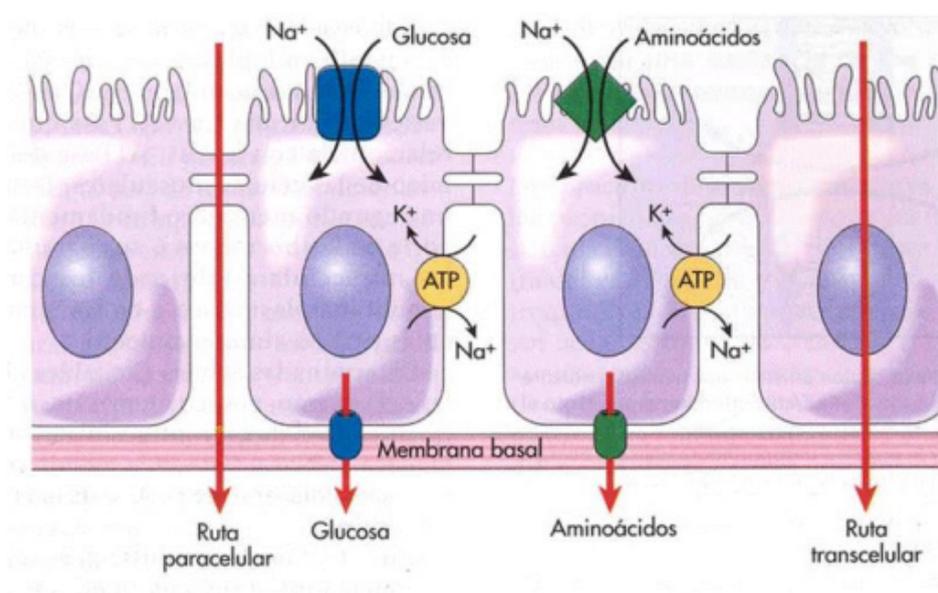


Figura 33. Mecanismos de transporte celular.

5.1.2. Métodos para la evaluación de la permeabilidad de fármacos

In silico es una expresión que significa “hecho por computadora o vía simulación computacional”, que se traduce de “en silicio” lo cual hace referencia al material del que están hechas las computadoras. Las tecnologías *in silico* se han integrado a la perfección en el descubrimiento y desarrollo de fármacos y proporcionan especialmente valiosas ventajas en la elaboración de perfiles ADME debido a su rendimiento extremadamente rápido y su bajo costo [18].

El servidor web PerMM es una herramienta computacional para la evaluación teórica de la permeabilidad pasiva de las moléculas a través de la bicapa lipídica. El método subyacente, fundamentado en la termodinámica, se basa en la teoría de solubilidad-difusión no homogénea y opera con estructuras atómicas 3D de los solutos y el modelo de disolvente anisotrópico de la bicapa de DOPC caracterizado por los parámetros de capacidad dieléctrica y de enlace de hidrógeno. El método PerMM calcula la afinidad de unión a la membrana, los perfiles de energía a lo largo de la normal de la bicapa y los coeficientes de permeabilidad de diversas moléculas a través de diferentes membranas [19, 20].

La base de datos PerMM recoge datos generados computacionalmente junto con coeficientes de permeabilidad experimentales obtenidos para membranas artificiales y naturales, incluyendo BLM, PAMPA, células Caco-2/MDCK y BBB. Actualmente contiene unas 500 moléculas, desde pequeños compuestos orgánicos hasta productos naturales de diversas estructuras químicas. La base de datos proporciona archivos de coordenadas descargables e información visual interactiva para representar las vías óptimas de localización y translocación de las moléculas a través de la bicapa lipídica. Los datos presentados permiten evaluar la contribución de la difusión pasiva al transporte de fármacos y otros compuestos a través de las membranas biológicas [19, 20].

Los métodos *in vivo* resultan altamente eficaces para predecir la absorción intestinal de fármacos, sin embargo, no son capaces de satisfacer los requerimientos productivos de las industrias en términos de costos, estabilidad y productividad [17]. Por otra parte, las técnicas *in silico* resultan muy útiles en la actualidad, pero el resultado obtenido es predictivo y luego debe ser corroborado con algún estudio experimental [10].

Por su parte, las metodologías experimentales *in vitro*, incluyen sistemas que se basan en el uso de tejidos extraídos de animales o humanos, o células y sistemas que utilizan membranas artificiales. Entre la primera serie de métodos, las monocapas de células Caco-2 (una línea celular de adenocarcinoma del colon y del recto de origen humano), constituyen un modelo ampliamente utilizado, debido a que contempla tanto el transporte pasivo como el transporte activo, siendo su principal desventaja el tiempo y costo de crecimiento de estas células, lo que la deriva en una técnica difícilmente aplicable para una investigación de alto rendimiento en la industria farmacéutica [21].

Por otro lado, y debido a que la mayoría de las moléculas activas son absorbidas principalmente mediante transporte pasivo, el uso de membranas artificiales, que imiten las membranas

biológicas, ofrece una estrategia de alto rendimiento y efectividad para establecer el potencial de absorción de un fármaco que es absorbido por este mecanismo [22]. Dentro de este tipo de estudios, el ensayo de permeabilidad de membranas artificiales paralelas (PAMPA, de sus siglas en inglés *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) [23] ha recibido considerable atención por parte de la industria farmacéutica, ya que permite la determinación fisicoquímica simple de la permeabilidad de un fármaco con un bajo costo y un alto rendimiento [24]. Sin embargo, la desventaja de esta técnica es el escaso volumen de los compartimentos dadores y receptores dentro de las placas que no mantiene las condiciones de sumidero durante los experimentos de permeación, y tampoco genera una condición de agitación [22, 25].

Otro método de permeabilidad *in vitro* es el ensayo en celdas de difusión de Franz con membranas artificiales biomiméticas [26]. Dicho método es uno de los más utilizados, ya que resulta una técnica simple, rápida y útil para predecir la absorción oral de fármacos con buena reproducibilidad y bajo costo. Además, presenta la ventaja de que la temperatura puede ser controlada, permitiendo mantener las celdas dadora y receptora bajo agitación continua y, en comparación con PAMPA, los compartimentos dador y receptor presentan mayor volumen, conservando las condiciones de sumidero durante el experimento de permeación [27]. Por estos motivos, esta técnica suele ser utilizada para los estudios de fármacos en términos de su absorción oral, contribuyendo a reemplazar y/o reducir el uso de animales de investigación [14, 28].

5.2. Objetivos

5.2.1. Objetivo general

Evaluar la permeabilidad del Mentol, Timol Eugenol y de sus prodrogas a través de un modelo *in silico* e *in vitro*.

5.2.2. Objetivos específicos

- Predecir el perfil de energía libre y el coeficiente de partición de los compuestos a través del servidor PerMM.
- Elaborar una membrana artificial biomimética (MAB).
- Realizar el estudio de permeabilidad *in vitro* a través de la MAB.
- Calcular la velocidad de permeación y los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) de cada compuesto ensayado.

5.3. Resultados

En los estudios de permeabilidad *in silico* e *in vitro* trabajamos con los compuestos de partida (Mentol, Timol y Eugenol) y dos de sus prodrogas, una de cadena alifática corta de metilos (**1c**, **2c** y **3c**) y una de cadena alifática larga (**1g**, **2g** y **3g**) (Figura 34). Basándonos en los resultados de los estudios de estabilidad química desarrollados en el Capítulo V, en ambos estudios de permeabilidad elegimos trabajar en un entorno de pH 5,8 ya que allí las prodrogas resultaron ser más estables.

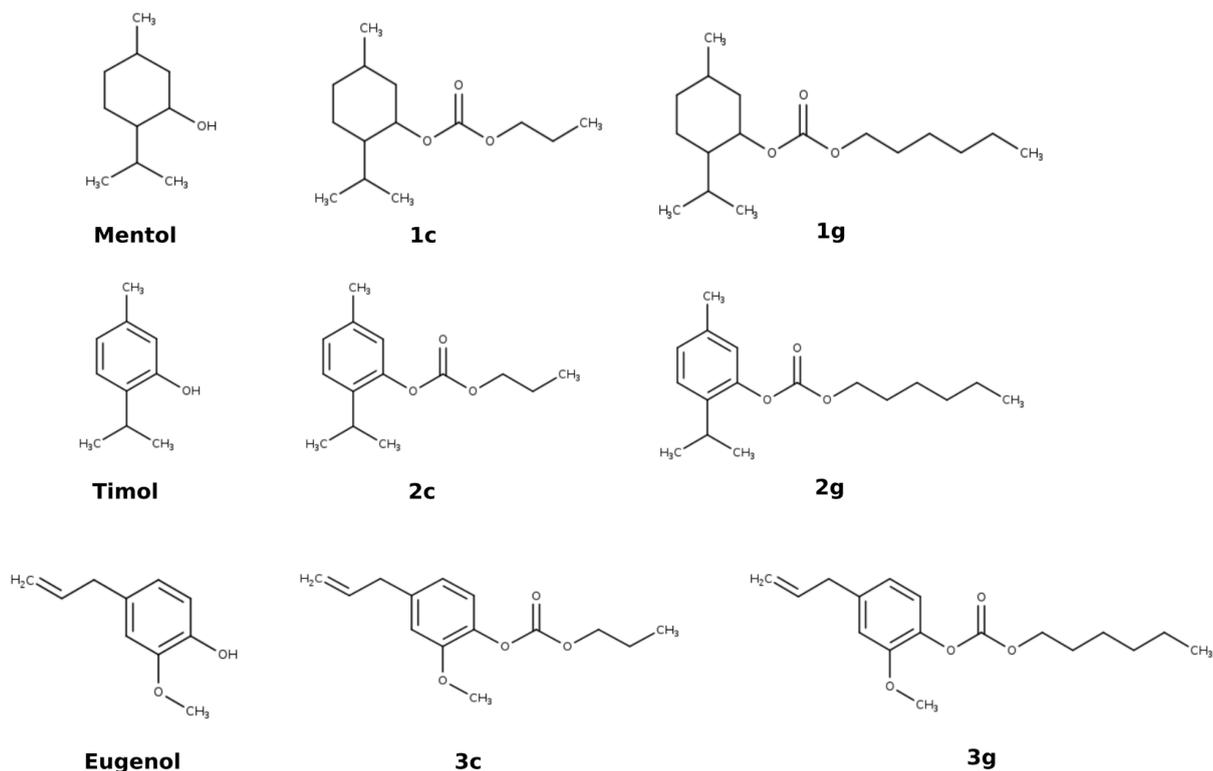


Figura 34. Estructura química de los compuestos seleccionados.

5.3.1. Predicción de permeación pasiva de la membrana a través de estudios *in silico*

Utilizando el servidor PerMM (<https://permm.phar.umich.edu/server>) evaluamos cómo interactuarían los compuestos con una membrana biológica, con la finalidad de determinar si son capaces de permeabilizar completamente en el citoplasma celular, o bien, si se acumulan dentro de la bicapa lipídica.

En la primera etapa, estimamos el perfil de energía libre de enlace (Energía kcal/mol⁻¹) de estos compuestos a través de una membrana que simula una bicapa de dipalmitoilfosfatidilcolina

(DOPC) (Figura 35-A, B y C). Cabe destacar que estas simulaciones se realizaron a 37°C y a un pH 5,8 (condiciones que se mantuvieron en los estudios *in vitro* a posterior). Se utilizó el método de optimización descrito por Lomize y colaboradores [20].

A partir del análisis de la Figura 35-A, B y C, demostramos que todos los compuestos presentan perfiles de energía negativos en todas las profundidades con un estado estable en el centro de la membrana. Este comportamiento es esperado debido a que los compuestos estudiados son hidrofóbicos, de modo que la partición se ve más favorecida en el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica que en la interfaz lípido-agua.

En la Figura 35 se observa que el mínimo energético de todos los compuestos se encuentra al momento de contacto con la primera capa lipídica (≈ 2 nm), y mientras más lipofílico es el compuesto mayor es la energía libre de enlace que presenta. Una vez que los compuestos atraviesan la primera capa lipídica aparece una barrera energética antes de atravesar la segunda capa lipídica.

Debido a que la barrera energética que poseen nuestros compuestos es baja y que el perfil de energía son similares a los observados en los compuestos descritos por Mollazadeh y colaboradores [29], es posible que estos en estos compuestos ocurra un movimiento "flip-flop" logrando teóricamente conseguir concentraciones mayores en el lado citoplasmático celular. Caso contrario, si se observan compuestos con una barrera energética mayor (≥ 5 kcal/mol-1) se predeciría que los compuestos se acumularían dentro de la membrana. En la Tabla 10 se encuentran los valores de energía libre de enlace en bicapa de DOPC para cada compuesto, donde se proyecta que a medida que la prodroga es más lipofílica, mayor es su energía de enlace libre de permeabilidad.

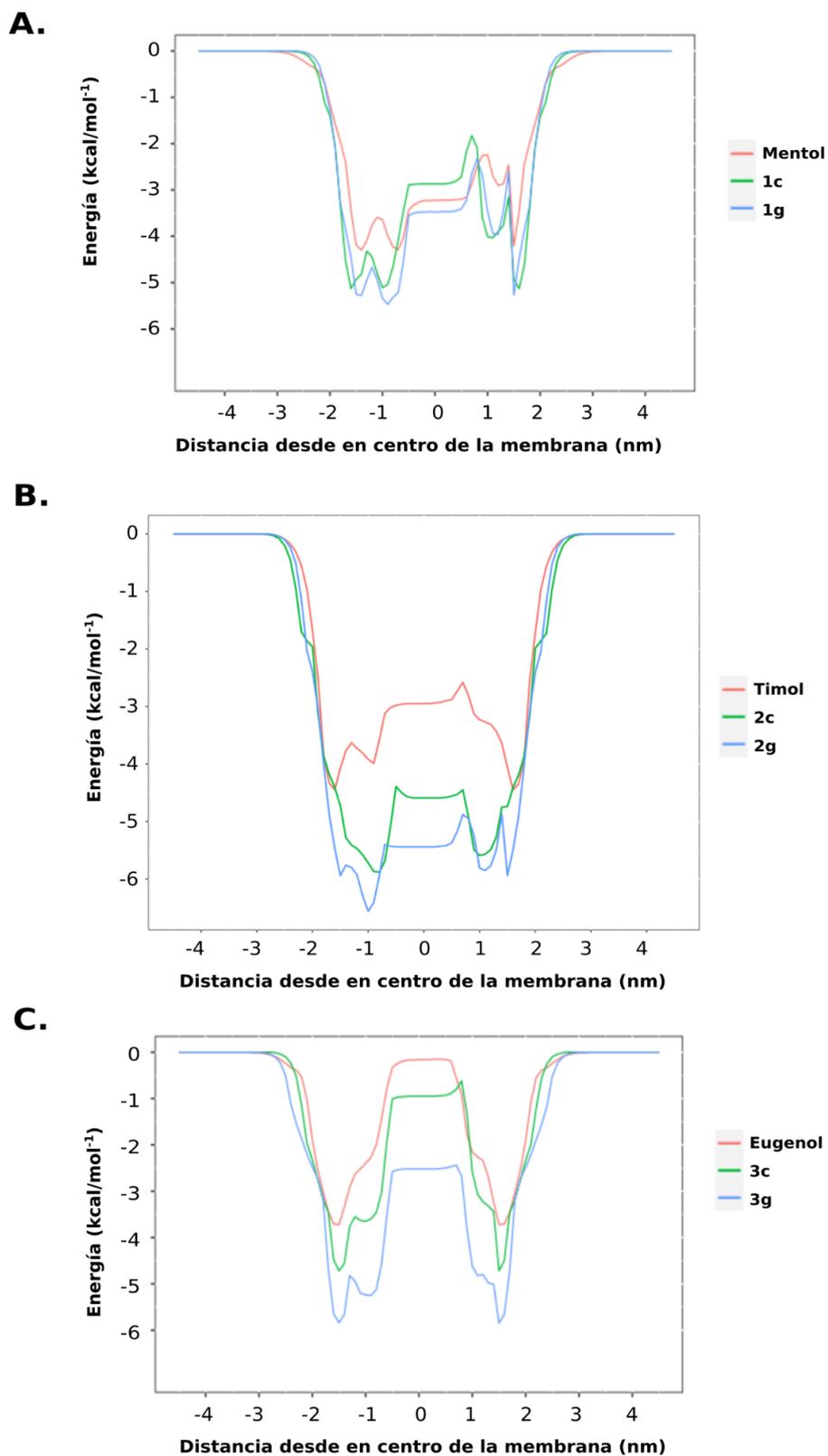


Figura 35. Perfiles de energía calculados para los compuestos a medida que se desplazan por la bicapa de DOPC. **A.** Mentol y sus prodrogas. **B.** Timol y sus prodrogas. **C.** Eugenol y sus prodrogas.

Tabla 10. Resultados del servidor PerMM para la permeabilidad pasiva de los compuestos.

Compuestos	Energía libre de enlace en bicapa de DOPC (kcal/mol)
Mentol (1)	-4,32
1c	-5,13
1g	-5,41
Timol (2)	-4,59
2c	-5,13
2g	-6,38
Eugenol (3)	-3,73
3c	-4,74
3g	-5,85

DOPC: dipalmitoilfosfatidilcolina.

5.3.2. Membrana artificial biomimética (MAB)

Desde que el método PAMPA fue introducido por Kansy y colaboradores, se han propuesto varias modificaciones en la composición de las membranas para que esta técnica pueda predecir la permeabilidad pasiva de los fármacos a través de la membrana intestinal [30-33], la barrera hematoencefálica [24, 34] o la capa dérmica humana [35]. Aunque la técnica PAMPA tiene la desventaja de predecir sólo el transporte pasivo de los fármacos debido a la falta de proteínas transportadoras, imposibilitando evaluar los fármacos transportados activamente y los fármacos que interactúan con las proteínas [36], es una herramienta ampliamente utilizada para el cribado de la permeabilidad pasiva en la fase temprana del descubrimiento de un fármaco.

Los ensayos PAMPA se llevan a cabo en una placa de filtro de 96 pocillos impregnada con una membrana artificial líquida que separa dos compartimentos, un donante cargado con un analito de prueba y un receptor que contiene una solución aceptora acuosa. En este sistema, un soporte filtrante, como el difluoruro de polivinilideno, el politetrafluoroetileno, el policarbonato o el éster de celulosa, se recubre con fosfolípidos naturales disueltos en un disolvente orgánico (normalmente *n*-dodecano). En el método utilizado en nuestros experimentos de membrana

lipídica artificial sustituimos la solución de *n*-dodecano por una solución de *n*-octanol de fosfolípidos (Lipoid 75) [28].

Las características estructurales del *n*-octanol, su capacidad para formar enlaces de hidrógeno y captar moléculas de agua, y su parámetro de solubilidad hacen que sus propiedades sean muy cercanas a las de las membranas biológicas basadas en fosfolípidos [28]. Por esta razón, el *n*-octanol se utiliza como solvente para obtener los valores de logP de nuevas moléculas [37].

Basándose en este concepto, preparamos una MAB disolviendo Lipoid 75 en *n*-octanol (ver métodos) [28]. Hay que tener en cuenta que es fundamental obtener una MAB adecuada que simule el comportamiento de la membrana intestinal natural. De esta manera, se obtiene un método de cribado de alto rendimiento para la evaluación y predicción rápida de las propiedades biofarmacéuticas de los fármacos para la identificación temprana de posibles problemas de biodisponibilidad [28].

Por otra parte, las limitaciones experimentales de los ensayos PAMPA clásicos, en los que se descuida la agitación o bien no existe, incluyen la influencia de la capa límite acuosa (ABL) adyacente a la superficie de la membrana, llamada capa de agua no agitada (UWL), que resulta de la agitación ineficiente durante el ensayo de permeabilidad. Esta barrera hidrodinámica podría conducir a la subestimación de la permeabilidad intrínseca de los fármacos hidrofóbicos, lo que daría lugar a una mala correlación de la permeabilidad aparente (P_{app}). Es por ello que los experimentos fueron realizados en celdas de difusión horizontal Franz (Figura 36) con agitación magnética en ambas cámaras para minimizar el efecto ABL en el transporte del fármaco a través de la membrana lipídica y para superar los efectos negativos del UWL del sistema PAMPA clásico [38] (ver métodos).

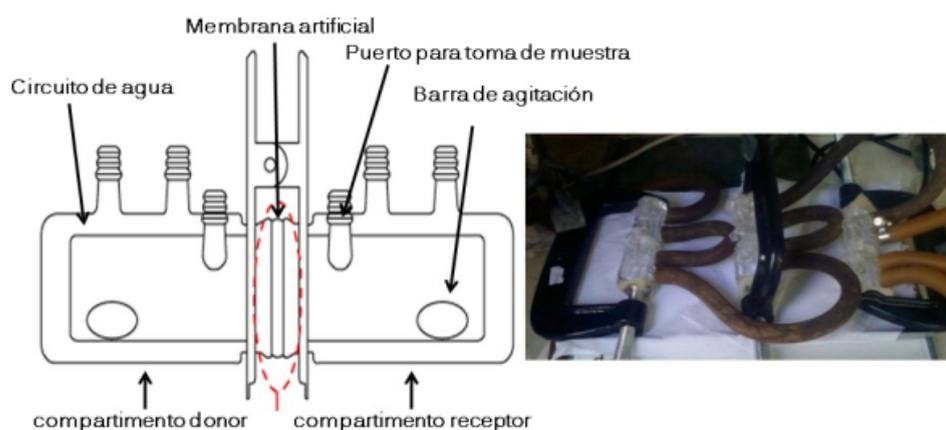


Figura 36. Esquema de una celda de difusión de Franz horizontal y fotografía de las celdas utilizadas en este ensayo (por triplicado) y con el correspondiente circuito de agua.

5.3.3. Estudio de permeabilidad *in vitro*

Los experimentos de permeabilidad los llevamos adelante en celdas de difusión con sus correspondientes celdas dadoras y receptoras, separados por la MAB (Figura 36). Según la validación del método, en el compartimento dador se agregó una solución salina de fosfato de pH 5,8 y en el compartimento aceptor, una solución salina de fosfato a pH 7,4 [28]. Durante toda la experiencia, las soluciones de las cámara dadora como aceptoras se han mantenido bajo agitación constante y a una temperatura de 37°C. Timol, Eugenol y sus prodrogas fueron identificados por la técnica de HPLC y por UV, tanto en la cámara dador como aceptoras. En cuanto al Mentol y sus prodrogas fueron cuantificados por CG.

Por cada compuesto calculamos el valor del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) y la velocidad de permeación (ver métodos). Los resultados se encuentran informados en la Tabla 11.

Tabla 11. Datos de velocidad (Vel) y permeabilidad aparente (P_{app}).

Compuesto	Vel (mg/d)	P_{app} (cm/s)
Mentol	$4,00 \times 10^{-5}$	$2,78 \times 10^{-4}$
1c	$1,48 \times 10^{-5}$	$4,06 \times 10^{-4}$
1g	$2,20 \times 10^{-5}$	$4,31 \times 10^{-4}$
Timol	$1,37 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$
2c	$5,70 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-4}$
2g	$3,64 \times 10^{-6}$	$2,20 \times 10^{-4}$
Eugenol	$1,14 \times 10^{-5}$	$6,80 \times 10^{-4}$
3c	$3,00 \times 10^{-6}$	$6,11 \times 10^{-4}$
3g	$5,00 \times 10^{-6}$	$6,90 \times 10^{-4}$

Del análisis de los resultados obtenidos, observamos que tanto los compuestos de partida como sus prodrogas permearon la MAB.

Tanto para las prodrogas del Mentol como el Timol obtuvimos el mismo comportamiento en relación a la permeabilidad aparente; observándose que las prodrogas presentaron una P_{app} mayor a los compuestos de partida coincidiendo con las predicciones realizadas en los estudios *in silico*;

es decir que mientras más lipofílico es el compuesto mayor fue la permeación del mismo. Por el contrario, en la serie restante se observaron valores muy similares entre el Eugenol y sus derivados, siendo el compuesto **3c** al que presenta el menor valor de P_{app} .

En cuanto a la velocidad de permeación, hallamos que los compuestos de partida presentaron mayor velocidad de permeación que las prodrogas. Este último comportamiento podría deberse a que el Mentol, Timol y Eugenol son moléculas más pequeñas que las prodrogas [39].

5.4. Discusión

La motivación del diseño de estas nuevas prodrogas surgen de la necesidad de hallar nuevas farmacoterapias eficaces y seguras para las EIDs. En el camino del diseño de nuevas entidades químicas para estas enfermedades se prefiere diseñar moléculas que luego puedan ser administradas por vía oral. La administración de fármacos por vía oral es la más conveniente y en general es la más segura, la menos costosa y, por lo tanto, la que se utiliza con más frecuencia, más aún cuando las enfermedades referidas se caracterizan por tener una alta incidencia y prevalencia en países con condiciones socioeconómicas pobres y limitaciones al acceso a los servicios de salud. Al administrar una nueva farmacoterapia a través de esta vía, se facilitarán múltiples aspectos tales como el almacenamiento, distribución y administración de la misma; afectando de manera positiva a la eficacia y adhesión de la farmacoterapia.

Esta situación incentiva la búsqueda de nuevas moléculas que favorezcan el desarrollo de nuevos medicamentos orales, que permitan mejorar la adherencia al tratamiento y ampliar el número de alternativas para pacientes que padecen estas enfermedades.

Debido a que es de interés hallar moléculas activas que puedan ser administradas por vía oral, es importante destacar que la absorción intestinal de un fármaco es una etapa esencial para el éxito terapéutico de farmacoterapias que serán administradas por vía oral. A su vez, se estima que más del 80% de las moléculas activas administradas por vía oral se absorben por transporte pasivo a nivel de las células epiteliales [40].

Sikkema y colaboradores reportaron que la permeabilidad de las membranas celulares depende de la hidrofobicidad de las moléculas, que tienen que atravesar la membrana, y de la composición de la membrana [41]. Por consiguiente, con el interés de analizar si las prodrogas sintetizadas logran permear las membranas biológicas, realizamos en una primera etapa una predicción a través de

estudios *in silico*; y en una segunda, un estudio *in vitro* a través de una membrana artificial biomimética.

La predicción *in silico* demostró que tanto los compuestos de partida como sus prodrogas permearían membranas lipídicas de forma pasiva debido a que son moléculas hidrofóbicas y por lo tanto la partición de los mismos se verá más favorecida en el núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica que en la interfaz lípido-agua [42, 43]. Para todos los compuestos se predijo que realizan movimientos "flip-flop" en los cuales, dependiendo del entorno, establecen la posición energéticamente más favorable para atravesar las membranas lipídicas.

De los estudios de permeabilidad *in vitro* corroboramos que tanto los compuestos de partida como sus prodrogas (**1c**, **1g**, **2c**, **2g**, **3c** y **3g**) lograron permear la MAB. Mayoritariamente, las prodrogas presentaron un mayor valor de P_{app} con respecto a sus compuestos de partida, este resultado coincide con la predicción realizada *in silico*. De manera contraria, se reportó que las velocidades de permeación fueron mayores para los compuestos de partida.

Delrivo y colaboradores utilizaron el mismo protocolo de estudio de permeabilidad *in vitro* con MAB para evaluar fármacos que actualmente se comercializan como Alopurinol, Amoxicilina, Atenolol, Cafeína, Carbamazepina, Furosemida, Metoprolol, entre otros [28]. Todos los fármacos que se ensayaron se administran por vía oral y se absorben por una vía de difusión pasiva [28]. A pesar de las diferencias estructurales entre dichos compuestos y los nuevos derivados diseñados, pudimos observar que la magnitud de la P_{app} que informan es comparable a la obtenida para **1c**, **1g**, **2c**, **2g**, **3c** y **3g** en los diferentes estudios realizados.

Es de interés destacar la diferencia encontrada entre la serie del Mentol y Timol, donde el Mentol presentó valores de velocidad de permeación y de permeabilidad aparente mayor que el Timol y su serie. Esta diferencia es importante reportarla debido a que son compuestos estructuralmente similares, solo difieren en que el Timol y su serie presentan aromaticidad y los derivados del Mentol no (Figura 3). Es por ello que se destaca que entre compuestos estructuralmente similares, la aromaticidad es un parámetro influyente en la velocidad de permeación y de permeabilidad aparente.

5.5. Conclusiones parciales

Concluimos que las prodrogas diseñadas y sintetizadas en esta Tesis lograron permear a través de una membrana artificial biomimética. Estos resultados nos permiten deducir la factibilidad del pasaje de estos nuevos compuestos a través de membranas biológicas.

5.6. Sección experimental

5.6.1. Predicción de permeación pasiva de la membrana a través de estudios *in silico*

Para construir y optimizar las estructuras tridimensionales de los compuestos se utilizó el software de código abierto UCSF Chimera [44] y para su visualización el programa PyMol [45]. Para estudiar la permeación de los compuestos se evaluó la eficiencia de su difusión pasiva a través de la bicapa lipídica. La evaluación se llevó a cabo utilizando el software de código abierto *Permeability of Molecules across Membranes* (PerMM), que permite predecir la permeabilidad a través de membranas artificiales y naturales [19]. Las simulaciones se realizaron a 37°C y pH 5,8; utilizando el método de optimización de arrastre descrito en [20].

5.6.2. Estudios de permeabilidad *in vitro*

5.6.2.1. Membrana artificial biomimética

El Mentol (**1**, pureza 99%, Sigma-Aldrich), Timol (**2**, pureza 99%, Sigma-Aldrich), Eugenol (**3**, pureza 99%, Sigma-Aldrich) fueron adquiridos por Sigma Aldrich®. Las prodrogas fueron obtenidas a través de la síntesis detallada en el Capítulo IV de esta Tesis. Todos los materiales y solventes utilizados fueron de grado analítico. El agua purificada fue obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q.

La MAB se obtuvo impregnando un soporte de ésteres de celulosa (membrana GS MS, tamaño de poro de 0,22 µm, 25 mm de diámetro, Millipore® Billerica, MA, USA) con un 10% (p/v) de una solución de *n*-octanol que contenía una mezcla de Lipoid 75 (lecitina de soja sin grasa con un 70% de fosfatidilcolina) (Tabla 12) [28].

El estudio fue llevado adelante utilizando un procedimiento *in vitro* en celdas de difusión de Franz desarrollado y validado previamente por el grupo de investigación [14, 28]. Las celdas de difusión de Franz horizontales, las cuales poseen un volumen aproximado de 2,2 mL en cada compartimento (dador y aceptor), las mismas se colocaron sobre una plancha de agitación de 6 centros, logrando una agitación constante (11 x 100 rpm) a ambos lados de la celda.

Tabla 12. Composición del Lipoid 75.

Fosfolípidos	Composición (g/100 g)
Fosfatidilcolina	68,0-73,0
Fosfatidiletanolamina	7,0-10,0
Lisofosfatidilcolina	<3

La membrana artificial impregnada con *n*-octanol se colocó entre el compartimento dador y aceptor de la celda de difusión de Franz. En el compartimento dador se agregó una solución salina de fosfato de pH 5,8 y en el compartimento aceptor 7,4 (conteniendo fosfato diácido de potasio, fosfato monoácido de sodio y cloruro de sodio) (PBS), la temperatura se mantuvo constante a 37°C mediante un circuito de agua con baño termostaticado. En el compartimento dador se colocaron 100 µg del compuesto correspondiente a evaluar.

A tiempos específicos se tomaron alícuotas de 1 mL, desde el compartimento receptor, las cuales fueron reemplazadas con el mismo volumen de PBS manteniendo la temperatura constante (37°C).

Las muestras de los derivados de Timol y Eugenol se analizaron por HPLC a longitudes de onda específicas, utilizando un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, con detector UV-Visible utilizando el software Dionex Chromeleon v.7.1.2 para la adquisición de datos. Equipado con una columna C18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula: 5 µm, tamaño poro: 120 Å) marca Phenomenex LC. Las fases móviles estuvieron constituidas por ACN: MeOH: Agua (50:40:10). Las mediciones de los derivados del Mentol se realizaron por CG en un cromatógrafo Agilent 7890A, con una columna ZB-WAX (60 mm largo x 0,250 mm ancho x 0,25 µm film) y con un detector de ionizador de llama, el límite de temperatura establecido fue de 20 - 250 °C, se utilizó Helio como gas carrier y un flujo de 2,00 mL/min.

Con el fin de monitorear el cumplimiento de la condición de sumidero durante los experimentos, fue calculada la relación entre la concentración de fármaco en los compartimentos receptor y dador a todos los tiempos, considerando apropiado un cociente menor a 0,1. Los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) y la velocidad fueron calculados a partir de la pendiente de la porción lineal inicial de los perfiles de permeación, de acuerdo a las ecuaciones 8 y 9, las cuales derivan de la primera Ley de Fick. Donde dQ/dt es la cantidad acumulativa del compuesto permeado en función del tiempo (mg/min), V es el volumen del compartimento receptor, A es el

área de superficie de la membrana, C_0 es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador y 60 es el factor de conversión de minutos a segundos.

$$\text{Velocidad} = \frac{dQ}{dt} \text{ ec. 8}$$

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A \cdot C_0 \cdot 60} \text{ ec. 9}$$

Adicionalmente, se realizó la comparación de los perfiles de permeabilidad por un modelo estadístico utilizando como método un ANOVA de una vía, en el que se realizó una comparación múltiple aplicando el post-test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa StudioR en Linux.

5.7. Bibliografía

- [1] D. Smith, P. Artursson, A. Avdeef, L. Di, G. F. Ecker, B. Faller, J. B. Houston, M. Kansy, E. H. Kerns, S. D. Kramer, *et al.*, “Passive lipoidal diffusion and carrier-mediated cell uptake are both important mechanisms of membrane permeation in drug disposition”, *Molecular pharmaceutics*, vol. 11, no. 6, pp. 1727-1738, 2014.
- [2] Q. Al Awqati, “One hundred years of membrane permeability: does overton still rule?”, *Nature cell biology*, vol. 1, no. 8, pp. E201-E202, 1999.
- [3] S. D. Kramer, H. E. Aschmann, M. Hatibovic, K. F. Hermann, C. S. Neuhaus, C. Brunner & S. Belli, “When barriers ignore the rule-of-five”, *Advanced drug delivery reviews*, vol. 101, pp. 62-74, 2016.
- [4] D. B. Kell & S. G. Oliver, “How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion”, *Frontiers in pharmacology*, vol. 5, p. 231, 2014.
- [5] J. L. Mikitsh & A. M. Chacko, “Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier”, *Perspectives in medicinal chemistry*, vol. 6, pp. PMC-S13384, 2014.
- [6] K. Sugano, M. Kansy, P. Artursson, A. Avdeef, S. Bendels, L. Di, G. F. Ecker, B. Faller, H. Fischer, G. Gerebtzoff, *et al.*, “Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport”, *Nature Reviews Drug discovery*, vol. 9, no. 8, pp. 597-614, 2010.

- [7] L. Di, P. Artursson, A. Avdeef, G. F. Ecker, B. Faller, H. Fischer, J. B. Houston, M. Kansy, E. H. Kerns, S. D. Kramer, *et al.*, “Evidence-based approach to assess passive diffusion and carrier-mediated drug transport”, *Drug discovery today*, vol. 17, no. 15-16, pp. 905-912, 2012.
- [8] D. B. Kell, P. D. Dobson & S. G. Oliver, “Pharmaceutical drug transport: the issues and the implications that it is essentially carrier-mediated only”, *Drug discovery today*, vol. 16, no. 15-16, pp. 704-714, 2011.
- [9] D. B. Kell, “What would be the observable consequences if phospholipid bilayer diffusion of drugs into cells is negligible?”, *Trends in pharmacological sciences*, vol. 36, no. 1, pp. 15-21, 2015.
- [10] G. Corti, F. Maestrelli, M. Cirri, S. Furlanetto & P. Mura, “Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: I. assessment of artificial membrane composition”, *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 27, no. 4, pp. 346-353, 2006.
- [11] Y. Fei, E. S. Kostewicz, M.-T. Sheu & J. B. Dressman, “Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an in vitro, in silico and in vivo approach”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 85, no. 3, pp. 1274-1284, 2013.
- [12] R. Gupta, B. S. Dwadasi, B. Rai & S. Mitragotri, “Effect of chemical permeation enhancers on skin permeability: In silico screening using molecular dynamics simulations”, *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1-11, 2019.
- [13] F. Lombardo, P. V. Desai, R. Arimoto, K. E. Desino, H. Fischer, C. E. Keefer, C. Petersson, S. Winiwarter & F. Broccatelli, “In silico absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetics (adme-pk): Utility and best practices. an industry perspective from the international consortium for innovation through quality in pharmaceutical development: Miniperspective”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 60, no. 22, pp. 9097-9113, 2017.
- [14] C. Aloisio, M. Ponce-Ponte, G. E. Granero & M. R. Longhi, “Effect of complexes and microemulsions on the permeability of drugs: Determination using a new biomimetic artificial membrane”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 6, pp. 2629-2638, 2018.

- [15] S. D. Kramer, “Quantitative aspects of drug permeation across in vitro and in vivo barriers”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 87, pp. 30-46, 2016.
- [16] H. Watson, “Biological membranes”, *Essays in biochemistry*, vol. 59, pp. 43-69, 2015.
- [17] L. Giorno, R. Mazzei & E. Drioli, “Biological membranes and biomimetic artificial membranes”, *Comprehensive Membrane Science and Engineering*, 2010.
- [18] P. V. Paranjpe, G. M. Grass & P. J. Sinko, “In silico tools for drug absorption prediction”, *American Journal of Drug Delivery*, vol. 1, no. 2, pp. 133–148, 2003.
- [19] A. L. Lomize, J. M. Hage, K. Schnitzer, K. Golobokov, M. B. LaFaive, A. C. Forsyth & I. D. Pogozeva, “Permm: A web tool and database for analysis of passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules”, *Journal of chemical information and modeling*, vol. 59, no. 7, pp. 3094-3099, 2019.
- [20] A. L. Lomize & I. D. Pogozeva, “Physics-based method for modeling passive membrane permeability and translocation pathways of bioactive molecules”, *Journal of chemical information and modeling*, vol. 59, no. 7, pp. 3198-3213, 2019.
- [21] M. Fujikawa, R. Ano, K. Nakao, R. Shimizu & M. Akamatsu, “Relationships between structure and high-throughput screening permeability of diverse drugs with artificial membranes: application to prediction of caco-2 cell permeability”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 13, no. 15, pp. 4721-4732, 2005.
- [22] G. Corti, F. Maestrelli, M. Cirri, N. Zerrouk & P. Mura, “Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: Ii. demonstration of the method suitability”, *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 27, no. 4, pp. 354-362, 2006.
- [23] M. Kansy, F. Senner & K. Gubernator, “Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 41, no. 7, pp. 1007-1010, 1998.
- [24] H. Sun, K. Nguyen, E. Kerns, Z. Yan, K. R. Yu, P. Shah, A. Jadhav & X. Xu, “Highly predictive and interpretable models for pampa permeability”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 25, no. 3, pp. 1266-1276, 2017.

- [25] M. Bermejo, A. Avdeef, A. Ruiz, R. Nalda, J. A. Ruell, O. Tsinman, I. Gonzalez, C. Fernández, G. Sanchez, T. M. Garrigues, *et al.*, “Pampa: a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, caco-2, and pampa permeability of fluoroquinolones”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 21, no. 4, pp. 429-441, 2004.
- [26] A. Malkia, L. Murtomaki, A. Urtti & K. Kontturi, “Drug permeation in biomembranes: in vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 23, no. 1, pp. 13-47, 2004.
- [27] A. C. Alves, I. I. Ramos, C. Nunes, L. M. Magalhaes, H. Sklenarova, M. A. Segundo, J. L. Lima & S. Reis, “Online automated evaluation of lipid nanoparticles transdermal permeation using franz diffusion cell and low-pressure chromatography”, *Talanta*, vol. 146, pp. 369-374, 2016.
- [28] A. Delrivo, C. Aloisio, M. R. Longhi & G. Granero, “Artificial lipid membrane permeability method for predicting intestinal drug transport: probing the determining step in the oral absorption of sulfadiazine; influence of the formation of binary and ternary complexes with cyclodextrins”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 3, pp. 1437-1447, 2018.
- [29] S. Mollazadeh, F. Hadizadeh & R. J. Ferreira, “Theoretical studies on 1, 4-dihydropyridine derivatives as p-glycoprotein allosteric inhibitors: insights on symmetry and stereochemistry”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, pp. 1-12, 2020.
- [30] A. M. Stewart, M. E. Grass, D. M. Mudie, M. M. Morgen, D. T. Friesen, and D. T. Vodak, “Development of a biorelevant, material-sparing membrane flux test for rapid screening of bioavailability-enhancing drug product formulations”, *Molecular pharmaceuticals*, vol. 14, no. 6, pp. 2032-2046, 2017.
- [31] F. Wohnsland & B. Faller, “High-throughput permeability profile and high-throughput alkane/water log p with artificial membranes”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 44, no. 6, pp. 923-930, 2001.
- [32] A. Bujard, C. Petit, P.-A. Carrupt, S. Rudaz & J. Schappler, “Hdm-pampa to predict gastrointestinal absorption, binding percentage, equilibrium and kinetics constants with human serum albumin and using 2 end-point measurements”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, pp. 143-150, 2017.

- [33] E. Sjogren, D. Dahlgren, C. Roos & H. Lennernas, "Human in vivo regional intestinal permeability: quantitation using site-specific drug absorption data", *Molecular pharmaceutics*, vol. 12, no. 6, pp. 2026-2039, 2015.
- [34] O. Tsinman, K. Tsinman, N. Sun & A. Avdeef, "Physicochemical selectivity of thebb microenvironment governing passive diffusion-matching with a porcine brain lipid extract artificial membrane permeability model", *Pharmaceutical research*, vol. 28, no. 2, pp. 337-363, 2011.
- [35] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, P. Soares-da Silva & A. Falcao, "A new pampa model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates", *International journal of pharmaceutics*, vol. 501, no. 1-2, pp. 102-111, 2016.
- [36] B. Sinko, T. M. Garrigues, G. T. Balogh, Z. K. Nagy, O. Tsinman, A. Avdeef & K. Takacs-Novak, "Skin-pampa: A new method for fast prediction of skin penetration", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, no. 5, pp. 698-707, 2012.
- [37] R. Bhardwaj & G. Chandrasena, "Optimal adme properties for clinical candidate and investigational new drug (ind) package", *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*, pp. 15-28, 2012.
- [38] A. Avdeef, "The rise of pampa", *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, vol. 1, no. 2, pp. 325-342, 2005.
- [39] T. Loftsson, F. Konradsdottir & M. Masson, "Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability", *International journal of pharmaceutics*, vol. 326, no. 1-2, pp. 60-68, 2006.
- [40] B. Juven, J. Kanner, F. Schved & H. Weisslowicz, "Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents", *Journal of applied bacteriology*, vol. 76, no. 6, pp. 626-631, 1994.
- [41] S. Nirasay, Y. Mouget, I. Marcotte & J. P. Claverie, "Supported bilayer on a nanopatterned membrane as model pampa membranes", *International journal of pharmaceutics*, vol. 421, no. 1, pp. 170-175, 2011.

- [42] J. Sikkema, J. A. de Bont & B. Poolman, "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons", *Microbiological reviews*, vol. 59, no. 2, pp. 201-222, 1995.
- [43] R. Lambert, P. N. Skandamis, P. J. Coote & G.-J. Nychas, "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol", *Journal of applied microbiology*, vol. 91, no. 3, pp. 453-462, 2001.
- [44] S. Burt, "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review", *International journal of food microbiology*, vol. 94, no. 3, pp. 223-253, 2004.
- [45] M. E. Sanchez, A. del V Turina, D. A. García, M. V. Nolan & M. A. Perillo, "Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 34, no. 2, pp. 77-86, 2004.
- [46] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng & T. E. Ferrin, "Ucsf chimera: a visualization system for exploratory research and analysis", *Journal of computational chemistry*, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612, 2004.
- [47] W. L. DeLano *et al.*, "Pymol: An open-source molecular graphics tool", *CCP4 News-letter on protein crystallography*, vol. 40, no. 1, pp. 82-92, 2002.

CAPÍTULO VII

Efectividad y citotoxicidad *in vitro* de las prodrogas diseñadas en *T. cruzi*, *L. braziliensis* y *P. falciparum*

Los ensayos realizados que se presentan en este Capítulo fueron desarrollados en una pasantía realizada en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia en Medellín-Colombia; las actividades fueron dirigidas y supervisadas por la Dra. Sara Robledo Restrepo.

6.1. Consideraciones generales

Una vez superada con éxito la etapa de síntesis, caracterización estructural, estabilidad química y permeación de los nuevos derivados de Mentol (**1a-i**), Timol (**2a-i**) y Eugenol (**3a-i**) se prosiguió al estudio de sus actividades biológicas. La evaluación de la actividad biológica de los nuevos derivados y la búsqueda de una posible relación entre ésta y sus propiedades fisicoquímicas, constituyen uno de los objetivos primordiales planteados en esta Tesis.

El grupo de investigación del PECET, perteneciente a la Universidad de Antioquia, dirigido por la Dra. Sara Robledo han abordado durante más de una década la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas contra la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria. De esta manera, en este Capítulo se han utilizado sus protocolos tanto para la medición de la citotoxicidad como la medición de la actividad biológica [1-3].

Los resultados de la citotoxicidad se expresan como CL_{50} , que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50% de muerte de las células no infectadas y los resultados de la actividad antiprotozoarias como CE_{50} , que es la concentración de droga necesaria para inhibir el 50% de la infección en las células (ver métodos). El coeficiente entre la actividad antiprotozoarias y la citotoxicidad, origina el índice de selectividad (IS) para cada compuesto en cada

actividad biológica determinada, el cual se utiliza para evaluar la efectividad selectiva de una droga, ya que tiene en cuenta ambos parámetros, actividad y toxicidad [1].

6.2. Objetivos

6.2.1. Objetivo general

Evaluar la citotoxicidad y la actividad tripanocida, leishmanicida y antiplasmódica *in vitro* de los compuestos de partida y de las prodrogas sintetizadas y caracterizadas en el Capítulo IV.

6.2.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos *in vitro* frente a líneas celulares U-937 y calcular la concentración letal media (CL₅₀).
- Evaluar la actividad tripanocida de los compuestos *in vitro* frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y calcular la concentración efectiva media (CE₅₀).
- Evaluar la actividad leishmanicida de los compuestos *in vitro* frente a amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* y calcular la concentración efectiva media (CE₅₀).
- Evaluar la actividad antiplasmódica de los compuestos *in vitro* frente a las formas totales de *P. falciparum* y calcular la concentración efectiva media (CE₅₀).
- Determinar el índice de selectividad (IS) de todos los compuestos.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Prodrogas del Mentol (1a-i)

Los resultados de la actividad citotóxica y biológica *in vitro* de los compuestos **1** y **1a-i** se resumen en la Tabla 13. Sólo los compuestos **1h** y **1i** mostraron ser citotóxicos para las células U-937, con valores de CL₅₀ de 48,4 µM y 44,1 µM, respectivamente; esta citotoxicidad observada corresponde a los compuestos de la serie con cadenas de carbono más lipofílicas. El resto de los compuestos mostraron una citotoxicidad de moderada a baja. Sin embargo, ningún derivado diseñado logró disminuir la actividad citotóxica del Mentol. Se destaca que la Anfotericina B (ANB), droga que actualmente se utiliza para el tratamiento de la Leishmaniasis, resultó ser más citotóxica que ciertos derivados sintetizados. También como se esperaba, la doxorubicina (DOXO) mostró una citotoxicidad elevada (1,7 µM) [4].

Tabla 13. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Mentol y sus prodrogas.

Compuesto	Citotoxicidad	Actividad tripanocida		Actividad leishmanicida		Actividad antiplasmodial	
	CL ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c
Mentol (1)	265,7±188,1	173,4±28,9	1,5	>128,0	>2,1	358,5±51,0	0,7
1a	68,5±6,7	105,45±34,5	0,6	22,9±2,8	3,0	127,4±9,9	0,5
1b	103,3±35,8	33,8±4,3	3,1	28,4±0,4	3,6	28,4±0,4	3,6
1c	57,0±14,4	33,9±2,8	1,7	31,8±4,1	1,8	60,7±1,2	0,9
1d	145,2±74,5	2061,7±175,4	0,1	43,2±0,3	3,4	60,7±1,0	2,4
1e	207,3±38,2	121,7±21,4	1,7	59,3±1,4	3,5	56,3±1,0	3,7
1f	221,5±21,1	29,6±1,2	7,4	96,7±0,6	2,3	59,1±2,6	3,7
1g	73,3±15,8	46,3±4,9	1,6	28,2±1,1	2,6	432,5±238,7	0,2
1h	48,4±6,1	27,6±4,4	1,8	>23,5	>2,1	67,4±5,8	0,7
1i	44,1±3,8	26,7±4,6	1,7	463,3±205,7	0,1	62,4±6,5	0,7
DOXO^d	1,7±0,2	NA ^e	NA	NA	NA	NA	NA
BNZ^f	>768,5	60,1±12,2	12,8	NA	NA	NA	NA
ANB^g	53,9±7,4	NA	NA	0,4±0,1	134,8	NA	NA
CQ^h	485,3±16,3	NA	NA	NA	NA	10,5±1,3	46,2

Los datos representan la concentración letal y efectiva para cada compuesto. ^aConcentración efectiva media. ^bConcentración efectiva media. ^cIS: Índice de selectividad = CL₅₀/CE₅₀; ^dDOXO: Doxorubicina; ^eNA: No aplica; ^fBNZ: Benznidazol; ^gANB: Anfotericina B; ^hCQ: Cloroquina.

La relación dosis-respuesta reveló de forma significativa que la mayoría de los compuestos fueron altamente activos contra los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y *L. braziliensis* [1].

Para *T. cruzi*, observamos que los compuestos **1b**, **1c** y **1f-i** mostraron una alta actividad tripanocida de 26,7 a 46,3 μM, mientras que el Mentol obtuvo una baja actividad con una CE₅₀ de 173,4 μM. El Benznidazol (BNZ), utilizado como compuesto de control para la actividad tripanocida, mostró una CE₅₀=60,1 μM. Por lo tanto, los nuevos compuestos con

alta actividad no sólo fueron más activos que el compuesto de partida, sino también más activos que el fármaco de referencia utilizado para el tratamiento de *T. cruzi* [4].

En cuanto a *L. braziliensis*, los compuestos **1a-d** y **1g** demostraron una alta y prometedora actividad contra los amastigotes intracelulares con valores de CE_{50} de 22,9 μM y 43,2 μM . Los compuestos **1e** y **1f** mostraron una actividad moderada con valores de CE_{50} de 53,3 μM y 96,7 μM , respectivamente. Destacamos que si bien ciertas prodrogas del Mentol obtuvieron una actividad leishmanicida alta, ninguno fue más activo que la ANB que obtuvo una $CE_{50}=0,4 \mu\text{M}$ [4].

En cuanto a la actividad antiplasmódica, comprobamos que sólo los compuestos **1b** y la Cloroquina (CQ) mostraron una elevada actividad, con valores de CE_{50} de 28,4 μM y 10,2 μM , respectivamente. Los compuestos **1c-f** y **1h-i** mostraron una actividad moderada de 56,3 a 67,4 μM , presentando una mayor actividad antiplasmódica que el Mentol ($CE_{50}=358,5 \mu\text{M}$). Por el contrario, el Mentol y los compuestos **1a** y **1g** mostraron una baja actividad antiplasmódica [4].

Para observar la relación entre la citotoxicidad y la actividad biológica reportada, usamos como indicador el índice de selectividad, que corresponde al cociente entre la CE_{50} en los diferentes estadios del parásito y la CL_{50} en células U-937. Entre mayor sea la relación, mayor será el valor del IS. Consideramos selectivos los compuestos con índice de selectividad de 3 o más, y muy selectivos, aquéllos con un IS de 8 o más.

En cuanto al IS calculado (Figura 37) se observó que el compuesto **1b**, **1e** y **1f** fueron selectivos para *P. falciparum*. En cuanto a *T. cruzi*, los compuestos **1b** y **1f** fueron selectivos, el compuesto **1f** fue el más selectivo de la serie con un IS de 7,5. En el caso de *L. braziliensis* los compuestos **1a**, **1b**, **1d** y **1e** fueron selectivos [4].

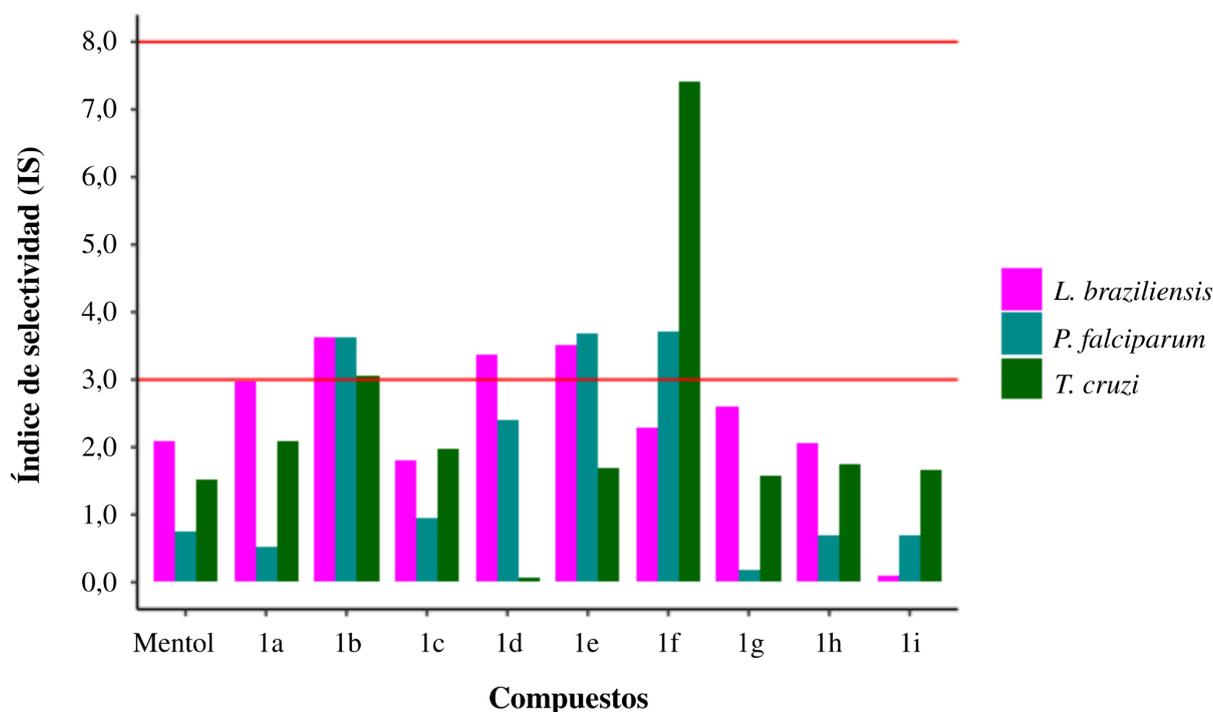


Figura 37. Índice de selectividad del Mentol y sus prodrogas. En asteriscos (*) se marcan los compuestos que no se logró cuantificar la actividad biológica con exactitud.

En el marco del desarrollo de los nuevos derivados de Mentol, se realizó una colaboración con el Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Sanidad y Ambiente (IIPROSAM), perteneciente en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP) donde se evaluó la eficacia *in vitro* e *in vivo* del Mentol y del compuesto **1f** frente a la Equinococosis Alveolar [5].

Dicha enfermedad es una de las zoonosis parasitarias más peligrosas. Esta enfermedad, ampliamente distribuida en el hemisferio norte, está causada por el estadio metacestode de la tenia *Echinococcus multilocularis*. Todos los pacientes quirúrgicos y no quirúrgicos deben realizar una quimioterapia con benzimidazoles, principalmente con Albendazol. Sin embargo, la eficacia del Albendazol es variable debido a sus deficientes propiedades farmacocinéticas. Por lo tanto, la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la Equinococosis Alveolar es urgente [6].

Por consiguiente, se realizó la evaluación de la eficacia *in vitro* contra las protoescolices de *E. multilocularis* y la eficacia *in vivo* contra el modelo murino de echinococosis alveolar. Se observó que el compuesto **1f** tuvo un mayor efecto protoescolicida que el Mentol. Además, la

prodroga demostró una eficacia clínica similar a la del Albendazol. Así pues, el compuesto **1f** se definió como un candidato prometedor para el tratamiento de la Equinocosis Alveolar. El desarrollo de este trabajo fue incluido en la Tesis doctoral de Julia Fabbri y en el manuscrito elaborado [5].

6.3.2. Prodrogas del Timol (2a-i)

Los resultados de la actividad citotóxica y biológica *in vitro* de los compuestos **2** y **2a-i** se resumen en la Tabla 14. En cuanto a la toxicidad en las células humanas U-937, el Timol mostró una CL_{50} 68,6 μ M considerándose moderadamente citotóxico. Las prodrogas **2a-i**, presentaron una $CL_{50} > 100$ μ M clasificándose con una citotoxicidad baja. De esta manera observamos que todos los nuevos derivados disminuyeron su actividad citotóxica respecto al Timol y a la droga ANB [7].

Todas las prodrogas del Timol, mostraron una actividad baja contra los amastigotes de *T. cruzi*, con valores de CE_{50} que variaron de 103,3 a 316,6 μ M. Resulta interesante destacar que el compuesto de partida Timol fue más activo frente a *T. cruzi* en relación a los nuevos derivados de la serie como así también de la droga BNZ [6]. Similar a lo observado frente a *T. cruzi*, las prodrogas del Timol mostraron una baja actividad frente a los amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, con valores de CE_{50} que variaron entre 172,5 y 355,0 μ M [7].

En el caso de la actividad antiplasmódica, los compuestos **2e** y **2h** fueron los más activos contra *P. falciparum* ($CE_{50} = 47,7$ μ M y 37,6 μ M, respectivamente). Los demás derivados mostraron una actividad moderada entre 50,1 μ M y 90,17 μ M. Destacamos que todos los derivados del Timol mostraron valores de CE_{50} mejores que el compuesto de partida ($CE_{50} = 468,9$ μ M), lo que sugiere que la modificación estructural aumenta la actividad antiplasmódica del Timol.

Tabla 14. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Timol y sus prodrogas.

Compuesto	Citotoxicidad	Actividad tripanocida		Actividad leishmanicida		Actividad antiplasmodial	
		CL ₅₀ (µM) ^a	CE ₅₀ (µM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (µM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (µM) ^b
Timol (2)	68,6±4,2	34,7±3,4	1,9	197,7±19,9	0,3	468,9±71,3	0,1
2a	366,9±38,3	107,2±4,5	3,4	245,7±16,3	1,4	90,2±7,5	4,0
2b	286,5±25,5	170,2±25,1	1,6	233,9±11,6	1,2	72,2±10,2	3,9
2c	351,5±28,0	119,3±12,3	2,9	172,5±20,0	2,0	58,4±3,8	6,0
2d	436,7±31,5	115,0±14,3	3,7	219,9±34,7	1,9	50,1±2,7	8,7
2e	389,5±56,9	131,1±4,0	2,9	211,1±14,9	1,8	47,7±3,5	8,1
2f	362,1±102,8	103,3±3,5	3,5	221,3±15,3	1,6	51,1±5,7	7,0
2g	105,0±12,3	106,1±2,9	0,9	355,0±15,6	0,3	86,5±9,8	1,2
2h	366,6±141,4	157,9±11,6	2,3	192,4±13,9	1,9	37,6±2,7	9,7
2i	107,3±40,9	316,6±76,9	0,3	220,7±87,5	0,4	65,1±3,5	1,6
DOXO^d	1,7±0,2	NA ^e	NA	NA	NA	NA	NA
BNZ^f	>768,5	60,1±12,2	12,8	NA	NA	NA	NA
ANB^g	53,9±7,4	NA	NA	0,4±0,1	134,8	NA	NA
CQ^h	485,3±16,3	NA	NA	NA	NA	10,5±1,3	46,2

Los datos representan la concentración letal y efectiva para cada compuesto. ^aConcentración efectiva media. ^bConcentración efectiva media. ^cIS: Índice de selectividad = CL₅₀/CE₅₀; ^dDOXO: Doxorubicina; ^eNA: No aplica; ^fBNZ: Benznidazol; ^gAMB: Anfotericina B; ^hCQ: Cloroquina.

En la Figura 38 se observa la comparación de la actividad antiparasitaria con la citotoxicidad donde observamos que todas las prodrogas del Timol mostraron mayor selectividad contra *P. falciparum* con valores de IS de 1,2 a 9,7. Los compuestos **2d**, **2e** y **2h** se determinaron como compuestos muy selectivos contra *P. falciparum* con un IS de 8,7, 8,1 y 9,7, respectivamente. Para *T. cruzi*, los compuestos más selectivos fueron **2d** seguido de **2f** y **2a** con IS de 3,7; 3,5 y 3,4, respectivamente. En cuanto a *L. braziliensis*, ningún compuesto mostró ser selectivo [7].

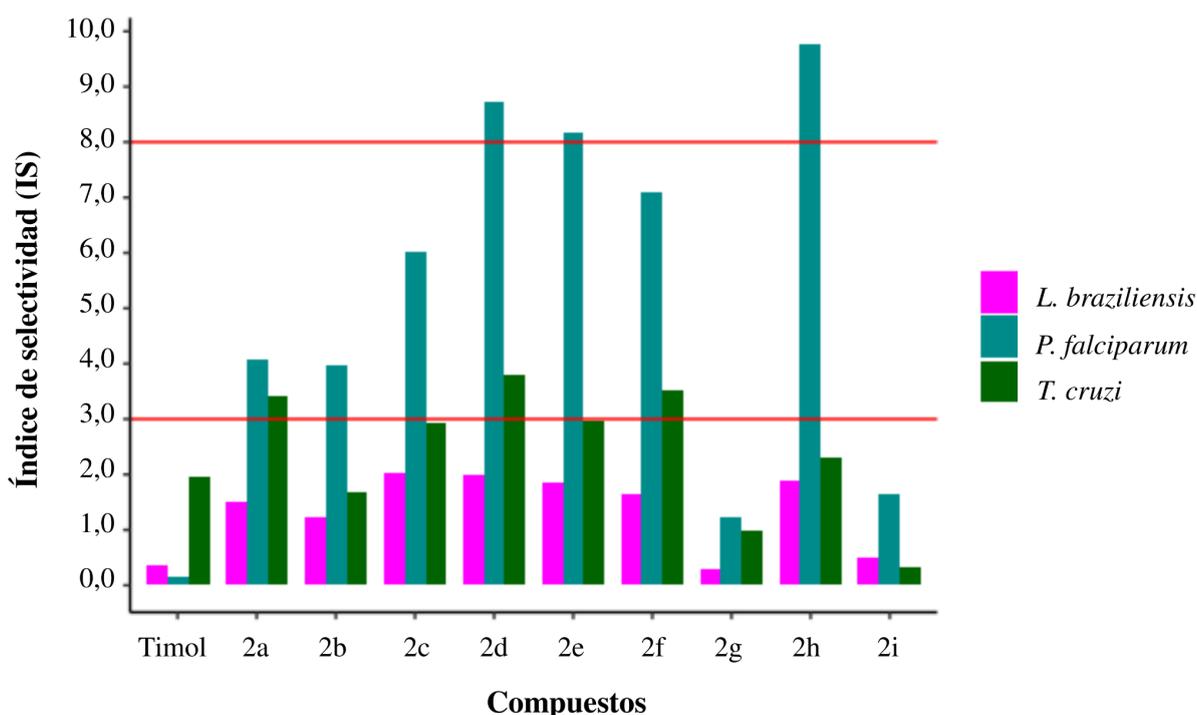


Figura 38. Índice de selectividad del Timol y sus prodrogas.

6.3.3. Prodrogas del Eugenol (3a-i)

La mayoría de los derivados del Eugenol presentaron una citotoxicidad moderada. Los compuestos **3g** y **3h** presentaron una citotoxicidad alta ($CL_{50}=40,6 \mu\text{M}$ y $43,5 \mu\text{M}$, respectivamente). Los compuestos **3c** y **3i** obtuvieron una citotoxicidad baja ($CL_{50} = 142,7 \mu\text{M}$ y $1960,0 \mu\text{M}$, respectivamente). Sólo los compuestos **3b**, **3c** y **3i** disminuyeron su actividad citotóxica respecto al Eugenol (Tabla 15) [8].

En cuanto a la actividad tripanocida, Eugenol fue el compuesto más activo frente a los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* con una $CE_{50} = 43,8 \mu\text{M}$, incluso más activo que la BNZ ($CE_{50} = 60,1 \mu\text{M}$). Sólo el compuesto **3i** mostró una actividad moderada con una CE_{50} de $65,1 \mu\text{M}$. Los demás compuestos mostraron una actividad baja que osciló entre $116,3$ y $639,5 \mu\text{M}$ [8].

Al igual que los resultados observados con *T. cruzi*, todos los compuestos sintetizados mostraron una actividad leishmanicida inferior a la del Eugenol, con la excepción del compuesto **3g** que tuvo una actividad elevada con una CE_{50} de $31,1 \mu\text{M}$, mientras que Eugenol obtuvo una CE_{50} de $60,4 \mu\text{M}$. Los compuestos **3c-f** mostraron una actividad moderada [8].

Tabla 15. Citotoxicidad y actividad antiprotozoaria *in vitro* del Eugenol y sus prodrogas.

Compuesto	Citotoxicidad	Actividad tripanocida		Actividad leishmanicida		Actividad antiplasmodial	
	CL ₅₀ (μM) ^a	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c	CE ₅₀ (μM) ^b	IS ^c
Eugenol (3)	79,7±10,8	43,8±8,1	1,8	60,4±9,4	1,3	665,6±29,9	0,1
3a	69,6±14,2	116,3±7,5	0,6	101,8±17,3	0,7	95,9±7,5	0,7
3b	96,3±16,8	354,6±42,0	0,3	>211,8	<0,3	32,6±4,2	3,0
3c	1960,0±179,9	324,4±53,1	6,0	89,5±30,9	21,9	104,5±0,6	18,8
3d	78,0±10,7	529,7±84,1	0,1	86,7±19,7	0,1	578,3±257,7	0,1
3e	55,2±4,7	>26,5	<2,1	61,8±3,4	0,9	84,8±29,3	0,7
3f	51,1±1,2	639,5±81,2	0,1	97,1±20,6	0,5	97,1±20,6	0,5
3g	40,6±3,8	>20,5	<1,9	31,1±3,6	1,3	>17,1	<2,7
3h	43,5±8,4	156,5±53,1	0,3	476,9±361,7	0,1	409,9±69,7	0,1
3i	142,7±8,3	65,1±5,2	2,2	>62,4	<2,3	311,9±76,7	0,5
DOXO ^d	1,7±0,2	NA ^e	NA	NA	NA	NA	NA
BNZ ^f	>768,5	60,1±12,2	12,8	NA	NA	NA	NA
AMB ^g	53,9±7,4	NA	NA	0,4±0,1	134,8	NA	NA
CQ ^h	485,3±16,3	NA	NA	NA	NA	10,5±1,3	46,2

Los datos representan la concentración letal y efectiva para cada compuesto. ^aConcentración efectiva media. ^bConcentración efectiva media. ^cIS: Índice de selectividad = CL₅₀/CE₅₀; ^dDOXO: Doxorubicina; ^eNA: No aplica; ^fBNZ: Benznidazol; ^gANB: Anfotericina B; ^hCQ: Cloroquina.

Se halló que el Eugenol no fue activo frente a *P. falciparum* con una CE₅₀ de 665,6 μM (109,29 μg/mL), un valor de actividad antimalárica comparable al encontrado por Zyl *et al.* [9] quienes reportaron una actividad antimalárica del Eugenol de 753,7 μM. Es significativo destacar que todos los nuevos derivados mejoraron la CE₅₀ dosis-respuesta contra *P. falciparum* con respecto al compuesto de partida. El compuesto **3b** mostró una actividad alta (CE₅₀ = 32,6 μM), los compuestos **3a**, **3e** y **3f** tuvieron una actividad moderada (valores de CE₅₀ de 95,9, 84,8 μM y 97,1 μM, respectivamente) [8].

En cuanto al IS (Figura 39) se observa que el compuesto **3c** fue selectivo para *T. cruzi* y muy selectivo para el *L. braziliensis* y *P. falciparum* [8].

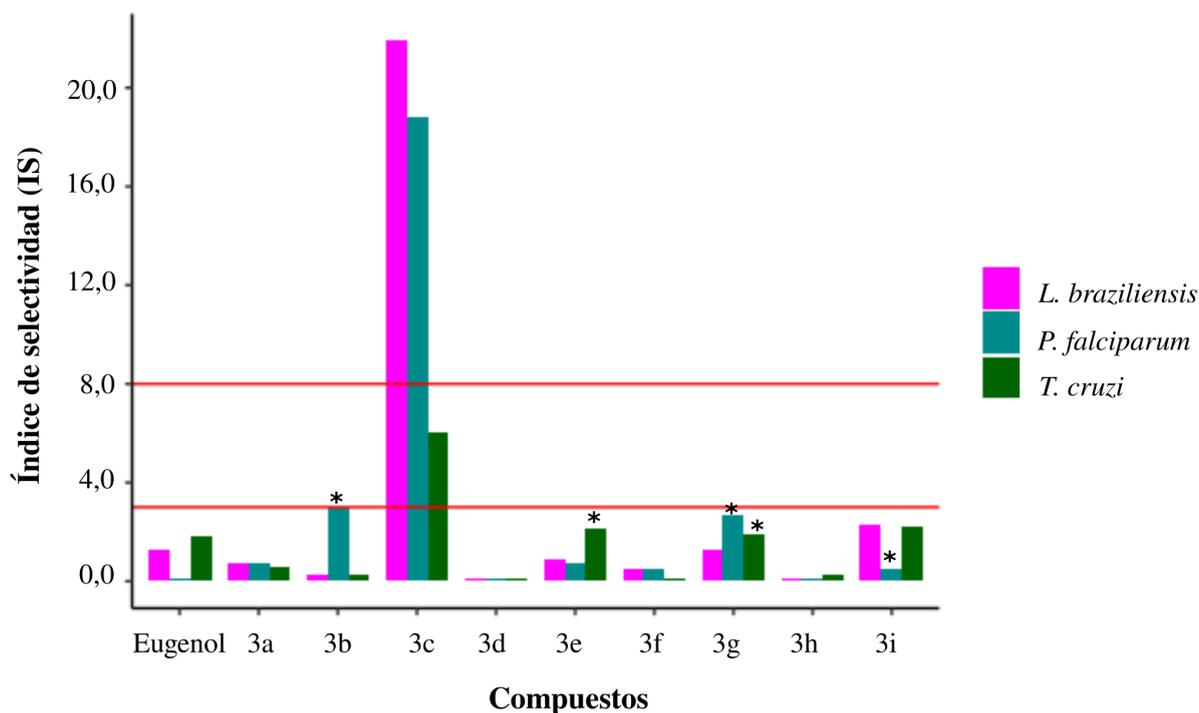


Figura 39. Índice de selectividad del Eugenol y sus prodrogas. En asteriscos (*) se marcan los compuestos que no se logró cuantificar la actividad biológica con exactitud.

6.4. Discusión y conclusiones parciales

Al evaluar la citotoxicidad de las prodrogas muchos compuestos resultaron tener una citotoxicidad alta en células U-937 de mamíferos. Aunque la toxicidad es un criterio importante en el desarrollo de nuevos fármacos, el criterio de la actividad biológica específica (en este caso, la actividad tripanocida, leishmanicida y antiplasmódica) es aún más importante ya que la citotoxicidad puede controlarse o reducirse mediante la aplicación de sistemas de administración de fármacos, como los liposomas, y otros tipos de nanopartículas que mejoran la actividad farmacológica, sin pérdida del potencial farmacológico. Por ejemplo, la ANB es un fármaco de uso actual para el tratamiento de la LC y LV que, en su forma libre (ANB desoxicolatada) se asocia a una elevada toxicidad renal, de modo que el tratamiento debe administrarse por vía intravenosa en pacientes hospitalizados. En cambio, si la ANB se encuentra en dispersión coloidal, complejos lipídicos y liposomas, tiene menos efectos adversos y genera una menor toxicidad renal [10,11].

De manera general, concluimos que los compuestos serie del Mentol (**1a-i**) fueron muy activos contra parásitos de *P. falciparum* y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y *L. braziliensis*. Además, logramos identificar derivados con mejor actividad tripanocida que el BNZ. En la serie del Timol (**2a-i**) hallamos en todos los compuestos una actividad antiplasmodial alta, además de un incremento marcado de actividad con respecto al compuesto de partida. En cuanto a la actividad frente a *T. cruzi* la misma fue moderada y frente a *L. braziliensis* fue baja. En cuanto a la serie del Eugenol (**3a-i**) observamos una alta actividad leishmanicida y antiplasmodial pero una baja actividad tripanocida.

Por último, basándonos en el IS, seleccionamos las moléculas candidatas para continuar en las etapas del diseño de fármacos, particularmente en las etapas de la evaluación de la actividad antiparasitaria *in vivo*. Las prodrogas seleccionadas son: **1f**, **2a**, **2d**, **2f** y **3c** para la evaluación de la actividad tripanocida; **1b**, **1d**, **1e** y **3c** para la actividad leishmanicida; y **2d**, **2e**, **2h** y **3c** para la actividad antiplasmodial.

6.5. Sección experimental

Todos los compuestos fueron sometidos a una evaluación *in vitro* de la citotoxicidad y de actividad tripanocida, leishmanicida y antiplasmódica. Los compuestos se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO, 1 mg/mL, p/v). Se prepararon soluciones madres de 200 g/mL (v/v) en medio RPMI-1640 completo y luego se prepararon diluciones seriadas cuádruples de cada compuesto. Finalmente, se probó cada compuesto a diferentes concentraciones (200, 50, 12,5, 3,125 y 0,78 µg/mL) [1].

6.5.1. Actividad citotóxica en células U-937 *in vitro*

La citotoxicidad se evaluó en la línea celular de promonocitos humanos U937. Los macrófagos humanos de la línea celular U-937 se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-1640 enriquecido con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y una solución de penicilina-estreptomicina al 1%. Las células se ajustaron a 1×10^5 células/mL en RPMI-1640 enriquecido. Luego, se colocaron 100 µL de suspensión celular y 100 µL de cada concentración de los compuestos en cada pocillo de la microplaca de cultivo de tejidos de 96 pocillos, y las placas se incubaron de nuevo a 37 °C, 5% de CO₂ [1].

Tras 72 h de incubación se añadieron 20 μ L (0,5 mg/mL) de MTT disuelto en medio RPMI-1640 sin suero en cada pocillo y las placas se incubaron durante 3 h a 37 °C, 5% de CO₂. La reacción se detuvo con 100 μ L/pocillo de DMSO y se registró la absorbancia a 570 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La doxorubicina (DOXO) se utilizó como control positivo y el medio RPMI-1640 enriquecido se utilizó como control negativo. Se utilizó una solución blanco (medio RPMI-1640 enriquecido más 0,2% de DMSO) para corregir la absorbancia. Cada medición se realizó por triplicado en dos experimentos independientes. Los resultados se expresaron como la concentración letal 50 (CL₅₀), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50 % de muerte celular [1].

6.5.2. Actividad tripanocida *in vitro*

Para la obtención de amastigotes, se sembraron 2,5x10⁶ células/ml células U-937 en medio RPMI 1640 y 100 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Para su adhesión, se colocaron 100 μ L en cada pocillo de una microplaca de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂. Después de 72 h de incubación, las células se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen en una proporción de 5:1 (24 h de crecimiento) por célula. Las placas se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂. Tras 24 h de incubación se añadieron 100 μ L de cada concentración de compuesto a cada pocillo y las placas se incubaron nuevamente a 37 °C, 5% de CO₂. Tras 72 h de incubación se añadieron 100 μ L de clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG) a 100 μ M y 0,1%, Nonidet P-40, y tras 3 h de incubación se leyó la absorbancia a 570 nm (Varioskan, Thermo) [10]. Las células infectadas expuestas al BZN se utilizaron como control de la actividad tripanocida (control positivo), mientras que las células infectadas y no tratadas se utilizaron como control de la infección (control negativo). Tanto la droga de control como los derivados a ensayar se realizaron disoluciones de los compuestos con una concentración de 200; 50; 12, y 3,125 μ g/mL. Cada medición se realizó por triplicado en dos experimentos independientes [1,10].

6.5.3. Actividad leishmanicida *in vitro*

Las células U-937 se ajustaron a 105 células/mL de RPMI-1640 enriquecido con 0,1 μ g/mL de PMA. Se dispensó un mL en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Después de 72 h, las células se infectaron con promastigotes de *L. braziliensis* (HMOM/COL/88/UA301-EGFP) [2] en una proporción de 15:1 (proporción de parásitos por

célula). Las placas se incubaron a 34 °C, 5% de CO₂, y 3 h después se eliminaron los promastigotes no internalizados mediante dos lavados con tampón fosfato (PBS). Las placas se incubaron de nuevo a 34 °C, 5% de CO₂, y 24 h después se lavaron las células con PBS caliente y se sustituyó el medio. Se añadieron 100 µl en cada pozo de cada dilución del compuesto (teniendo como punto de partida el doble de la CL₅₀ del compuesto correspondiente) a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂. Después de 72 h, se extrajeron las células con una solución de tripsina/EDTA y se lavaron dos veces con PBS centrifugando 10 min a 1100 rpm, 4 °C. Las células se leyeron en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500MPL, Brea, CA) a 488 nm de excitación (láser de argón) y contando 10.000 eventos. El porcentaje de células infectadas se calculó mediante un análisis de puntos según los eventos positivos para la fluorescencia verde y luego se calculó la carga de parásitos en estas células infectadas mediante un análisis de histograma según la intensidad media de fluorescencia (MFI). Las células infectadas se utilizaron como control de la infección (control negativo) y las células infectadas expuestas a ANB se utilizaron como control de la actividad leishmanicida (control positivo) [9, 10]. Tanto la droga de control como los derivados a ensayar se realizaron disoluciones de los compuestos con una concentración de 200; 50; 12, y 3,125 µg/mL. Cada medición se realizó por triplicado en dos experimentos independientes [2, 3].

6.5.4. Actividad antiplasmodial *in vitro*

Las células U-937 se ajustaron a 105 células/mL de RPMI-1640 enriquecido con 0,1 µg/mL de PMA. Se dispensó un mL en cada cultivo de *P. falciparum* no sincronizado (cepa 3D7) [13] y se ajustó al 0,5% de parasitemia y al 1% de hematocrito en medio RPMI enriquecido con albúmina de suero bovino rica en lípidos-Albumax II al 3%. En cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos, se añadieron 100 µl de suspensión de parásitos y 100 µl de cada dilución de los compuestos. Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C, 90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂. Tras la incubación, se cosecharon los sobrenadantes y los parásitos se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación de 20 min. En una segunda placa microtiter de 96 pocillos de fondo plano se dispensaron 100 µl de reactivo Malstat, pH 9,0, 25 µl de solución NBT/PES y 15 µl de parásitos lisados. Las placas se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante 90 min y el desarrollo del color de la reacción de pLDH se leyó a 650 nm (Varioskan, Thermo) [14]. La CQ se utilizó como control antiplasmodico positivo. Los parásitos cultivados en RPMI-1640 enriquecido se utilizaron como control de

crecimiento y viabilidad (control negativo). Tanto la droga de control como los derivados a ensayar se realizaron disoluciones de los compuestos con una concentración de 200; 50; 12, y 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada medición se realizó por triplicado en dos experimentos independientes [1].

6.5.5. Análisis de datos

Para calcular la citotoxicidad, se calcularon los porcentajes de mortalidad para cada concentración ensayada según la ecuación 10:

$$\% \text{ Mortalidad} = 100 - [(\text{OD células expuestas}/\text{OD células no expuestas}) \times 100] \text{ ec. 10}$$

A continuación, estos porcentajes de mortalidad se utilizaron para calcular las concentraciones letales medias (CL_{50}) mediante un análisis Probit utilizando el software Graphpad Prism 8 [15].

En el caso de la actividad antiprotozoarias (*L. braziliensis*, *T. cruzi* y *P. falciparum*), el porcentaje en la reducción de parásitos para cada concentración ensayada se cuantificó mediante la ecuación 11:

$$\% \text{ Reducción de parásitos} = 100 - [(\text{OD o MFI parásitos expuestos}/ \text{OD o MFI parásitos de control}) \times 100] \text{ ec. 11}$$

La selectividad de la actividad para cada compuesto se determinó según el IS que corresponde a la relación entre la citotoxicidad y la actividad antiprotozoarias y se calculó como el cociente al dividir la LC_{50} y la CE_{50} , ecuación 12:

$$\text{IS} = \text{LC}_{50}/\text{CE}_{50} \text{ ec. 12}$$

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Tanto la citotoxicidad como la actividad antiprotozoaria se clasificaron como alta, moderada o baja, según rangos previamente establecidos en base a los propios criterios de acierto. Citotoxicidad alta: $\text{CL}_{50} < 50 \mu\text{M}$, moderada: $\text{LC}_{50} > 50 \mu\text{M} < 100 \mu\text{M}$ y baja citotoxicidad: $\text{CL}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Del mismo modo, la actividad antiprotozoaria se clasificó agrupada según los valores de CE_{50} , basándose en los criterios propios en alta ($\text{CE}_{50} < 50 \mu\text{M}$), moderada ($\text{CE}_{50} > 50 \mu\text{M} < 100 \mu\text{M}$) y baja actividad ($\text{CE}_{50} > 100 \mu\text{M}$). En cuanto al IS, entre mayor sea la relación, mayor será el valor

del índice de selectividad. Se consideraron selectivos los compuestos con índice de selectividad de 3 o más, y muy selectivos, aquellos con un índice de 8 o más.

6.6. Bibliografía

- [1] V. Cuartas, S. M. Robledo, I. D. Vélez, M. D. P. Crespo, M. Sortino, S. Zacchino, M. Noguerras, J. Cobo, Y. Upegui, T. Pineda, *et al.*, “New thiazolyl-pyrazoline derivatives bearing nitrogen mustard as potential antimicrobial and antiprotozoal agents”, *Archiv der Pharmazie*, vol. 353, no. 5, p. e1900351, 2020.
- [2] S. A. Pulido, D. L. Muñoz, A. M. Restrepo, C. V. Mesa, J. F. Alzate, I. D. Vélez & S. M. Robledo, “Improvement of the green fluorescent protein reporter system in leishmania spp. For the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs”, *Acta tropica*, vol. 122, no. 1, pp. 36-45, 2012.
- [3] J. A. Murillo, J. F. Gil, Y. A. Upegui, A. M. Restrepo, S. M. Robledo, W. Quiñones, F. Echeverri, A. San Martín, H. F. Olivo & G. Escobar “Antileishmanial activity and cytotoxicity of ent-beyerene diterpenoids”, *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 27, no. 1, pp. 153-160, 2019.
- [4] C. M. Clemente, S. M. Robledo & S. Ravetti, “Menthol carbonates as potent antiparasitic agents: synthesis and in vitro studies along with computer-aided approaches”, Preprint. Aceptado en *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022.
- [5] Fabbri, C. M. Clemente, N. Elissondo, G. Gambino, S. Ravetti, L. Y. Hergert, S. D. Palma & M. C. Elissondo, “Anti-echinococcal activity of menthol and a novel prodrug, menthol-pentanol, against echinococcus multilocularis”, *Acta tropica*, vol. 205, p. 105411, 2020.
- [6] E. Brunetti, P. Kern & D. A. Vuitton, “Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans”, *Acta tropica*, vol. 114, no. 1, pp. 1–16, 2010.
- [7] C. M. Clemente, S. Ravetti, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, T. Pineda, and S. M. Robledo, “Synthesis, in vitro antiprotozoal activity and cytotoxicity of new thymol carbonate derivatives”, *ChemistrySelect*, vol. 6, no. 25, pp. 6597-6600, 2021.

- [8] C. M. Clemente, T. Pineda, L. M. Yepes, Y. Upegui, D. A. Allemandi, S. M. Robledo & S. Ravetti, “Eugenol carbonate activity against plasmodium falciparum, leishmania braziliensis, and trypanosoma cruzi”, *Archiv der Pharmazie*, vol. 355, no. 3, p. 2100432, 2022.
- [9] R. L. Van Zyl, S. T. Seatlholo, S. F. Van Vuuren & A. M. Viljoen, “The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents”, *Journal of Essential Oil Research*, vol. 18, no. sup1, pp. 129-133, 2006.
- [10] J. P. B. Aguirre & A. M. R. Hamid, “Amphotericin b deoxycholate versus liposomal amphotericin b: Effects on kidney function”, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 11, 2015.
- [11] C. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, G. Wei, Y. Huang, H. Yu, Y. Gan, Y. Wang, L. Mei, *et al.*, “Recent progress in drug delivery”, *Acta pharmaceutica sinica B*, vol. 9, no. 6, pp. 1145-1162, 2019.
- [12] F. S. Buckner, C. Verlinde, A. C. La Flamme & W. C. Van Voorhis, “Efficient technique for screening drugs for activity against trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 40, no. 11, pp. 2592–597, 1996.
- [13] W. Trager & J. B. Jensen, “Human malaria parasites in continuous culture”, *Science*, vol. 193, no. 4254, pp. 673–675, 1976.
- [14] S. Nkhoma, M. Molyneux & S. Ward, “In vitro antimalarial susceptibility profile and prcrt/pfmdr-1 genotypes of plasmodium falciparum field isolates from malawi”, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 76, no. 6, pp. 1107-1112, 2007.
- [15] D. J. Finney, “Statistical method in biological assay”, *Statistical method in biological assay*, no. 2nd edn, 1964.

CAPÍTULO VIII

Identificación de un nuevo blanco terapéutico a través de estudios *in silico*

Los estudios computacionales se realizaron en colaboración con la Lic. María Inés Freiburger y el Dr. Diego Ferreiro del Laboratorio de Fisiología de Proteínas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

7.1. Consideraciones Generales

7.1.1. Química Computacional

La Química Computacional es una disciplina que combina diferentes campos, incluyendo la Química, la Biología, la Física, la Estadística y la Bioinformática. Permite simular procesos químicos y biológicos, con multitud de aplicaciones utilizando métodos *in silico* que emplean modelos matemáticos y *software* de simulación [1].

De modo general, la Química Computacional tiene dos aplicaciones fundamentales. En primer lugar, sus herramientas permiten explicar comportamientos observados experimentalmente. Y en segundo lugar, proporciona instrumentos predictivos, que permite generar nuevos conocimientos en situaciones en las que por algún motivo no se puede desarrollar un experimento en mesada. Esto puede deberse a que el experimento puede resultar imposible o muy arduo de realizar, o las propiedades de interés pueden ser muy difíciles de medir [2].

La ventaja del uso de los métodos *in silico* en comparación con métodos experimentales es que reduce gastos derivados de la compra de materiales, evita la producción de compuestos contaminantes, y permite acelerar el proceso de investigación, por ejemplo, en etapas iniciales del desarrollo de fármacos. Situándonos en este trabajo de Tesis, antes de realizar la síntesis de los derivados de interés fue posible predecir propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de los mismos (Capítulo III), corroborando de esta manera que los derivados que posteriormente sintetizamos (Capítulo IV) cumplían los requisitos deseados.

El acelerado desarrollo de *software* en los últimos tiempos ha generado una gran variedad de herramientas de visualización de moléculas, de modelado, de simulación molecular, entre otros, los cuales han permitido avanzar notoriamente en la comprensión de muchos sistemas químicos y biológicos [3]. Los métodos *in silico* desarrollados para la descripción del comportamiento de la materia a nivel molecular pueden dividirse en dos grandes tipos: métodos *ab initio* y métodos atomísticos.

Las técnicas *ab initio* describen la estructura electrónica y la reactividad de sistemas moleculares a partir de postulados mecano-cuánticos, mientras que los métodos atomísticos utilizan los principios de la mecánica clásica para simular sistemas a nivel atómico, pudiendo determinarse de esta manera propiedades macroscópicas a partir de postulados de la física estadística [4,5]. Esta última metodología desarrollaremos en el presente Capítulo, obteniendo como resultado la información necesaria para explicar los detalles del comportamiento proveniente de la interacción proteína-ligando en un sistema de interés biológico [6].

7.1.2. Dihidroorotato deshidrogenasa

Los protozoos apicomplejos (*Plasmodium* spp.) y los kinetoplastidos (*Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.) son protistas unicelulares con ciclos vitales complejos en los que intervienen un huésped mamífero y un insecto vector. Sus ciclos vitales hacen que tengan cambios adaptativos complejos y, en consecuencia, una expresión regulada de macromoléculas funcionales específicas de cada etapa. Estas macromoléculas, que en su mayoría son proteínas, proporcionan blancos terapéuticos racionales en el diseño de fármacos [7].

Las pirimidinas son esenciales para la supervivencia celular y la proliferación de organismos parasitarios, como *T. cruzi*, *L. braziliensis* y *P. falciparum*. En las células humanas, las pirimidinas se sintetizan a través de las vías de biosíntesis *de novo* o por vía de rescate, siendo esta última una forma eficaz de reciclar los nucleótidos preexistentes.

Debido a que un gran número de organismos parasitarios carecen de vías de rescate de pirimidina para los pirimidinucleótidos, el bloqueo de la biosíntesis *de novo* se considera una estrategia terapéutica eficaz para atacar selectivamente al parásito sin afectar al huésped humano [8].

La dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) está surgiendo como un nuevo blanco molecular para los fármacos antiparasitarios contra las EIDs [8-11]. Esta proteína es la única enzima redox de las seis implicadas en la vía biosintética *de novo* de las pirimidinas; dicha proteína cataliza la oxidación del (S)-dihidroorotato a orotato (Figura 40) [8].

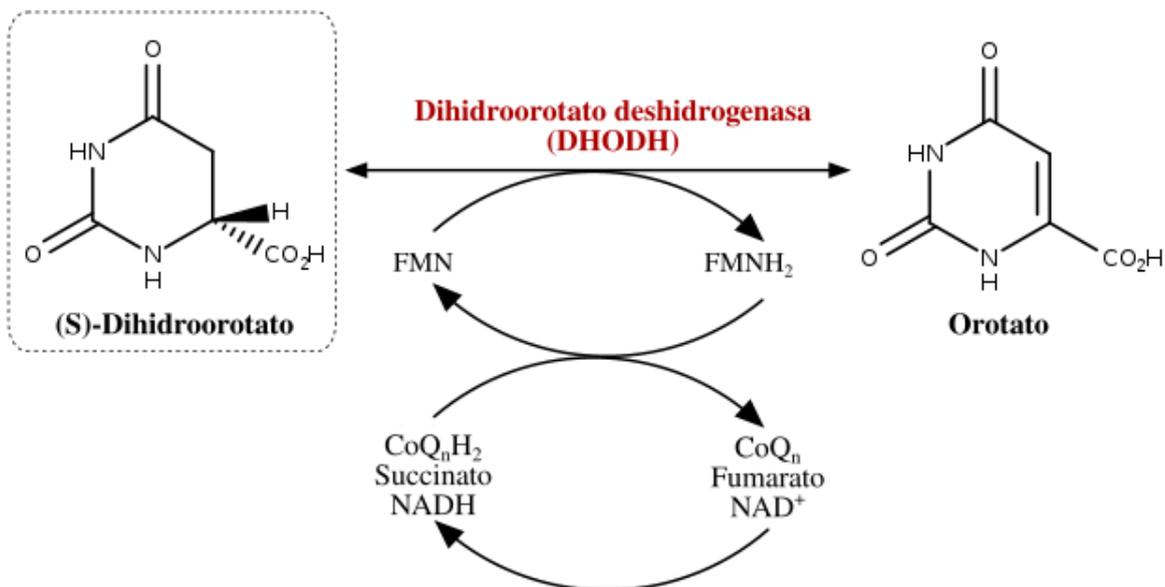


Figura 40. DHODH cataliza dos semirreacciones reversibles. En la primera mitad de la reacción redox, la (S)-Dihidroorotato es oxidada por el cofactor FMN. En la segunda, el grupo prostético FMN es reoxidado por fumarato o NAD⁺ en la DHODH de Clase 1 o ubiquinonas (CoQ_n) en las variantes mitocondriales de la DHODH de Clase 2.

Enzyme Commission number clasifica las enzimas según la actividad catalítica otorgándoles un código compuesto de las letras EC, seguida de cuatro números separados por un punto, el primer número indica la clase (actualmente se conocen siete: Oxidorreductasas, Transferasas, Hidrolasas, Liasas, Isomerasas, Ligasas y Translocasas), mientras que los demás representan una clasificación progresivamente más específica [12, 13].

Las DHODH son oxidorreductasas, por lo tanto se corresponden a la Clase 1 de EC. Estas enzimas, se clasifican según su similitud de secuencia, ubicación celular y preferencia de sustrato [14]. Existe la Clase 1 (EC.:1.3.3.1) que se subdivide en Clases 1A y 1B; y la Clase 2 (EC.:1.3.99.11). Los tripanosomátidos como *T. cruzi* y *L. braziliensis* expresan la DHODH de Clase 1A, que es una proteína homodimérica localizada en el citosol que usa el fumarato como aceptor de electrones. Sin embargo, *P. falciparum* expresa la DHODH de la Clase 2; que es monomérica y se encuentra unida a la membrana mitocondrial interna y utiliza la

ubiquinona como aceptor de electrones. Los residuos implicados en el sitio activo de la enzima difieren entre las clases de DHODH, la Clase 1 posee una cisteína; en cambio, la Clase 2 posee una serina [14-17].

Diferentes investigadores reportaron la relevancia de la enzima *T. cruzi* dihidroorotato deshidrogenasa (TcDHODH) ya que los parásitos *T. cruzi* deficientes de DHODH no son viables incluso ante la presencia de nucleósidos de pirimidina, debido a que los parásitos no poseen la vía de rescate de las pirimidinas [18,19].

Chibili *et al.* demostraron que compuestos naturales derivados de los isoprenoides pueden desempeñar un papel en la actividad leishmanicida a través de la inhibición de la DHODH [10]. Estos compuestos con estructuras similares a los sustratos de las enzimas en las vías biosintéticas de los parásitos pueden mostrar propiedades enzimáticas inhibitorias. Esto ocurre debido a la similitud estructural existente entre estas moléculas y los sustratos naturales de las proteínas involucradas en las vías biosintéticas de los parásitos, donde se genera una competición entre las moléculas para unirse al sitio de unión del sustrato [20].

En la actualidad, se están llevando a cabo estudios en los que evalúan la competencia enzimática de compuestos naturales con estructuras similares a nuestros compuestos de partida (Mentol, Timol y Eugenol) cómo agentes terapéuticos emergentes para la inhibición enzimática de proteínas parasitarias [21-24]. Según la bibliografía y los estudios de estabilidad realizados (Capítulo V), no es probable que las prodrogas diseñadas se mantengan intactas y lleguen a la proteína objetivo en un sistema biológico debido a los mecanismos de hidrólisis que sufren a los diferentes pH's. Es por este motivo que los estudios que se describen a continuación se realizaron con los compuestos de partida y no con las prodrogas.

Debido a todo lo mencionado, en este Capítulo presentamos los estudios *in silico* desarrollados con el objetivo de analizar la potencial formación de complejos proteína-ligando entre los compuestos de partida (Mentol, Timol y Eugenol) con las enzimas dihidroorotato deshidrogenasa de *T. cruzi* (TcDHODH), de *L. braziliensis* (LbDHODH) y de *P. falciparum* (PfDHODH), para lograr sentar bases teóricas para futuros estudios *in vitro* en el desarrollo de terapias antiparasitarias dirigidas a la DHODH.

7.2. Objetivos

7.2.1. Objetivo general

Predecir si las proteínas TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH podrían ser un potencial blanco molecular para Mentol, Timol y Eugenol a través de estudios *in silico*.

7.2.2. Objetivos específicos

- Analizar la secuencia aminoacídica y la estructura proteica de TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH.
- Validar el acoplamiento molecular con AutodockVina.
- Realizar el acoplamiento molecular de las moléculas de Mentol, Timol y Eugenol con TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH.
- Realizar 12 simulaciones de dinámica molecular de 120 ns cada una (ver Esquema 2).
- Analizar la estabilidad conformacional mediante el análisis de la raíz cuadrática media (RMSD) e identificar los residuos o regiones flexibles a través del cálculo de la fluctuación media (RMSF) de los complejos simulados.
- Calcular la energía libre de unión de cada complejo formado.
- Analizar la contribución energética de cada residuo en el complejo.

7.3. Resultados

7.3.1. Análisis de la secuencia aminoacídica y estructura proteica de TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH

Las proteínas tienen cuatro niveles de estructura (Figura 41). La estructura primaria de una proteína es simplemente el orden de sus aminoácidos (secuencia aminoacídica), por convención el orden de escritura es siempre desde el grupo amino-terminal hasta el carboxilo-terminal.

La estructura secundaria de una proteína es la que adopta espacialmente, existen ciertas estructuras repetitivas encontradas en las proteínas que se clasifican en dos tipos: hélice alfa y hojas beta, conocidas como motivos estructurales. La estructura terciaria, está compuesta de un solo polipéptido, es la estructura plegada y completa en tres dimensiones que define la estructura de la proteína. Por último, la estructura cuaternaria, sólo está presente si hay más de una cadena polipeptídica (ejemplo: homodímero).

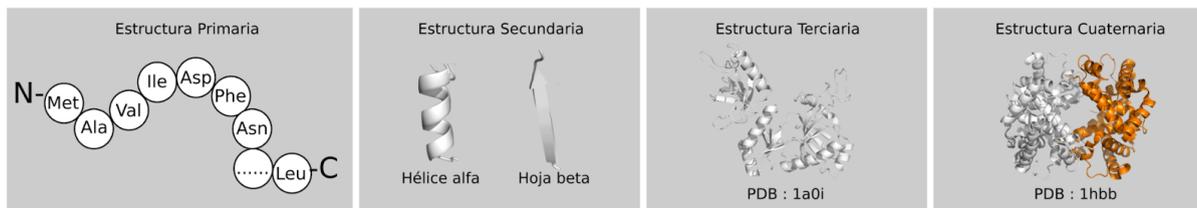


Figura 41. Estructuras de las proteínas.

Para los análisis, se seleccionaron las siguientes proteínas TcDHODH (PDB ID: 2E68/Cadena B), LbdHODH (PDB ID: 4WZH/Cadena B) y PfdHODH (PDB ID: 4CQA/Cadena B) que fueron cristalizadas a alta resolución: 1.38 Å, 2.12 Å y 2.82 Å, respectivamente. Con la finalidad de identificar y caracterizar similitudes y diferencias entre ellas se realizó un análisis de la secuencia aminoacídica y de estructura de las proteínas (ver métodos). En la Figura 42 se ilustra el alineamiento múltiple de secuencias que se realizó de TcDHODH, LbdHODH y PfdHODH. En color lila se encuentran marcadas las posiciones del alineamiento en las cuales la identidad del aminoácido coincide entre las proteínas, cuando las tres proteínas coinciden en sus aminoácidos el color es más intenso.

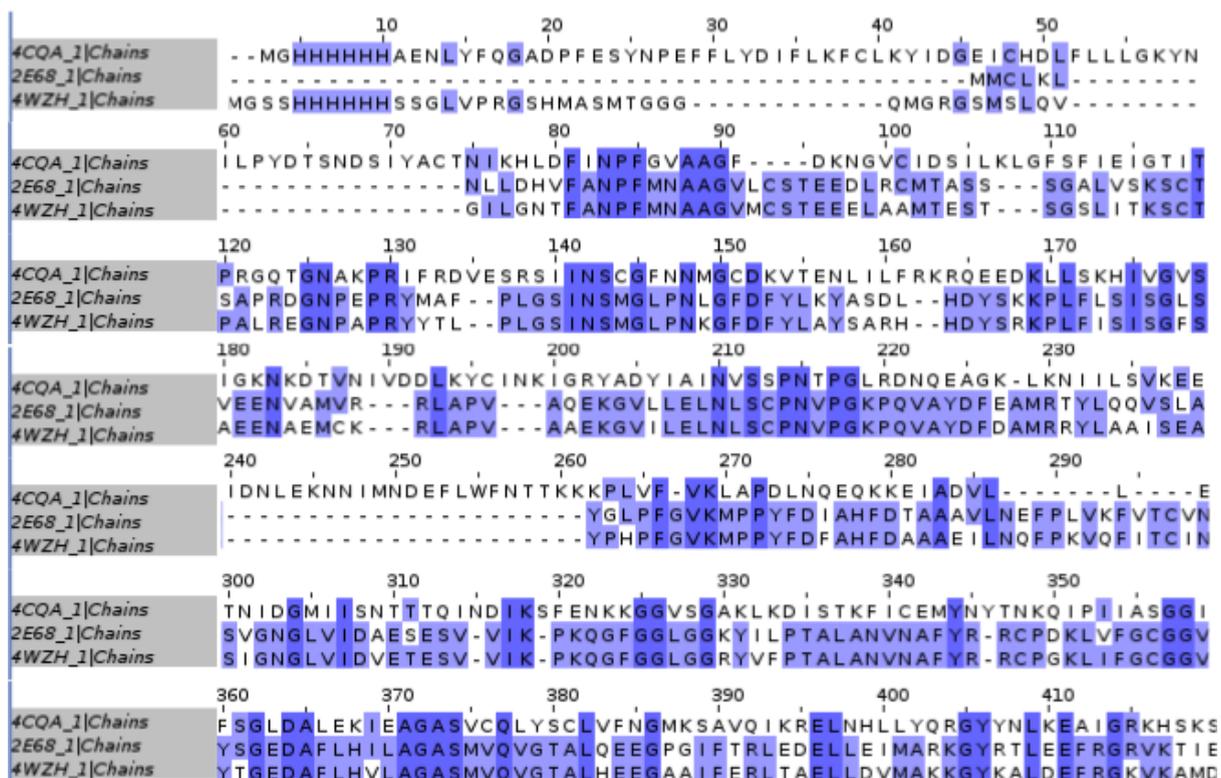


Figura 42. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de PfdHODH (PDB ID: 4CQA), TcDHODH (PDB ID: 2E68) y LbdHODH (PDB ID: 4WZH). En lila se encuentran remarcados las posiciones del alineamiento en las cuales la identidad del aminoácido coincide entre las proteínas.

En las Tablas 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis realizado. Las celdas correspondientes a la diagonal principal, coloreadas en gris representan el porcentaje de identidad entre las proteínas consigo mismas, esto significa que el valor esperado en estas celdas es del 100 %, de esta forma podemos controlar que los alineamientos se realizaron de forma adecuada.

En la Tabla 16 se muestra que TcDHODH y LbDHODH tienen una identidad de secuencia de $\approx 70\%$; mientras que estas proteínas con respecto a PfdDHODH presentan una identidad de secuencia $\approx 25\%$.

Tabla 16. Porcentaje de identidad de secuencia.

% Identidad de secuencia	PfdDHODH	TcDHODH	LbDHODH
PfdDHODH	100,0	25,5	24,3
TcDHODH	25,5	100,0	73,2
LbDHODH	24,3	73,2	100,0

En la Figura 43 se muestra el resultado del alineamiento estructural de las tres proteínas en estudio. En la Figura 43A se presenta el alineamiento estructural entre TcDHODH y LbDHODH, donde se puede observar a modo cualitativo, que la identidad estructural entre ambas es alta. En la Figura 43B se alineó también la proteína PfdDHODH, en este caso podemos visualizar que la identidad estructural no es tan similar a la observada entre TcDHODH y LbDHODH.

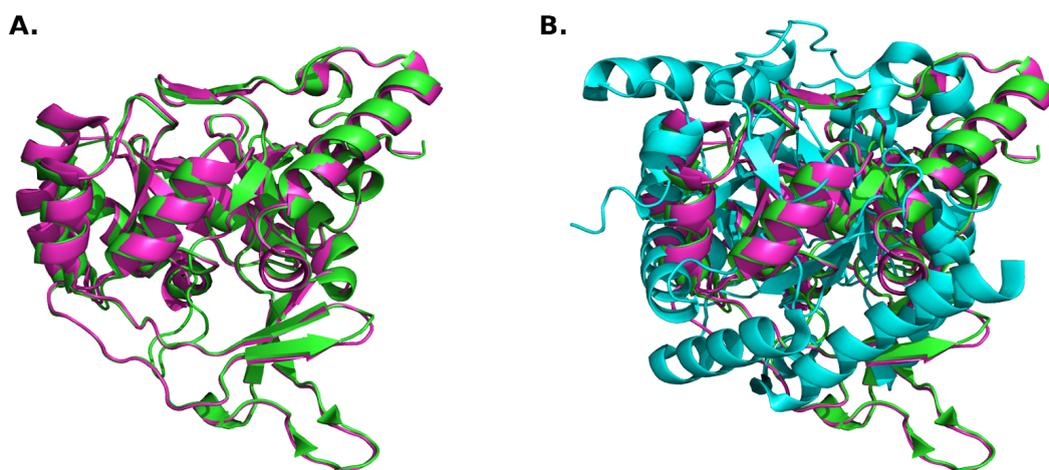


Figura 43. Alineamiento estructural de A. TcDHODH (verde) y LbDHODH (rosa).

B. TcDHODH (verde), LbDHODH (rosa) y PfdDHODH (celeste).

De modo cuantitativo, en la Tabla 17 se observa que TcDHODH y LbDHODH poseen un porcentaje de identidad de estructura $\approx 95\%$. Sin embargo, PfDHODH con respecto a TcDHODH y LbDHODH presentan un porcentaje de identidad de estructura $\approx 70\%$.

Tabla 17. Porcentaje de identidad de estructura.

% Identidad de secuencia	PfDHODH	TcDHODH	LbDHODH
PfDHODH	100,0	69,7	70,1
TcDHODH	69,7	100,0	95,1
LbDHODH	70,1	95,1	100,0

El porcentaje de identidad de secuencia y estructura superior obtenido entre las proteínas TcDHODH y LbDHODH es esperado, ya que ambas proteínas comparten la misma ubicación celular (citósol) y utilizan el mismo aceptor de electrones (succinato). En cambio, estas proteínas poseen un bajo porcentaje de identidad de secuencia y estructura con respecto a PfDHODH. Esto se debe a que PfDHODH posee algunas diferencias en cuanto a estas proteínas, como por ejemplo, se ubica en la membrana mitocondrial interna de la célula y utiliza el fumarato como aceptor de electrones. Es importante destacar que, a pesar de las diferencias halladas en cuanto a estructura y secuencia, las tres proteínas cumplen la misma función en sus respectivos organismos: catalizar la oxidación de (S)-dihidroorotato a orotato para la biosíntesis de las pirimidinas.

7.3.2. Acoplamiento molecular (*Molecular Docking*)

El acoplamiento molecular o *molecular docking* (del inglés, acoplarse) es un método que predice la conformación más adecuada de una molécula al estar unida a otra con el fin de formar un complejo estable [25]. Esta predicción la realiza estimando la pérdida de entropía al momento de unión del ligando con la proteína [26].

AutodockVina es una de las tantas herramienta que se encuentran disponible para realizar acoplamiento molecular, este *software* posee diversas ventajas a comparación de los demás como por ejemplo, es de código abierto, no genera un alto costo computacional y es una herramienta sencilla de utilizar.

En primer lugar se debe corroborar que el algoritmo seleccionado es adecuado para el modelo biológico a estudiar. Para ello, obtuvimos los complejos de las proteínas seleccionadas con

sus ligandos naturales cristalizados, extrajimos los ligandos de sus complejos y realizamos el acoplamiento con AutodockVina de cada uno con su proteína correspondiente.

Después, calculamos la raíz cuadrática media (RMSD, del inglés, *Root Mean Square Deviation*) (ver métodos) para cada pose usando como referencia la estructura cristalizada. Si el valor del RMSD de la pose está por debajo de 1,0 Å se considera que el resultado es aceptable, aunque muchos autores aumentan este valor de corte hasta 1,5 Å o incluso hasta 2,0 Å. Por encima de este valor límite los resultados se consideran incorrectos, estableciendo que la herramienta no es precisa para el modelo biológico a estudiar.

Debido a que los valores de RMSD obtenidos (Tabla 18) fueron por debajo de 1,0 Å entre la estructura del sustrato natural cristalizado y la estructura predicha a partir del acoplamiento molecular, se establece que la herramienta AutodockVina es precisa para nuestro modelo biológico a estudiar [27].

Tabla 18. Valores RMSD para la superposición de los sustratos cristalizados y acoplados.

Proteína	PDB ID	RMSD (Å)
TcDHODH	2E68	0,041
LbDHODH	4WZH	0,882
PfDHODH	4CQA	0,191

Luego de validar la herramienta, acoplamos el Mentol, Timol y Eugenol al sitio de unión del sustrato de TcDHODH, LbDHODH y PfDHODH utilizando AutoDockVina. Se seleccionó la conformación energicamente más favorable de cada ligando (Tabla 19) para formar el complejo proteína-ligando que posteriormente fue sometida a las simulaciones de dinámica molecular.

Tabla 19. Energía de unión (en kcal/mol) de las conformaciones acopladas más favorables según la puntuación de AutoDockVina.

Compuestos	Energía de unión (kcal/mol)		
	TcDHODH	LbDHODH	PfDHODH
Sustrato natural	-7,1	-6,5	-7,2
Mentol	-6,7	-5,7	-6,8
Timol	-6,0	-5,8	-6,7
Eugenol	-6.4	-6,0	-7,1

7.3.3. Simulaciones de dinámica molecular

Usando AMBER20 (ver métodos), se realizaron 12 simulaciones de dinámica molecular de 120 ns por cada complejo representadas en la Figura 44.

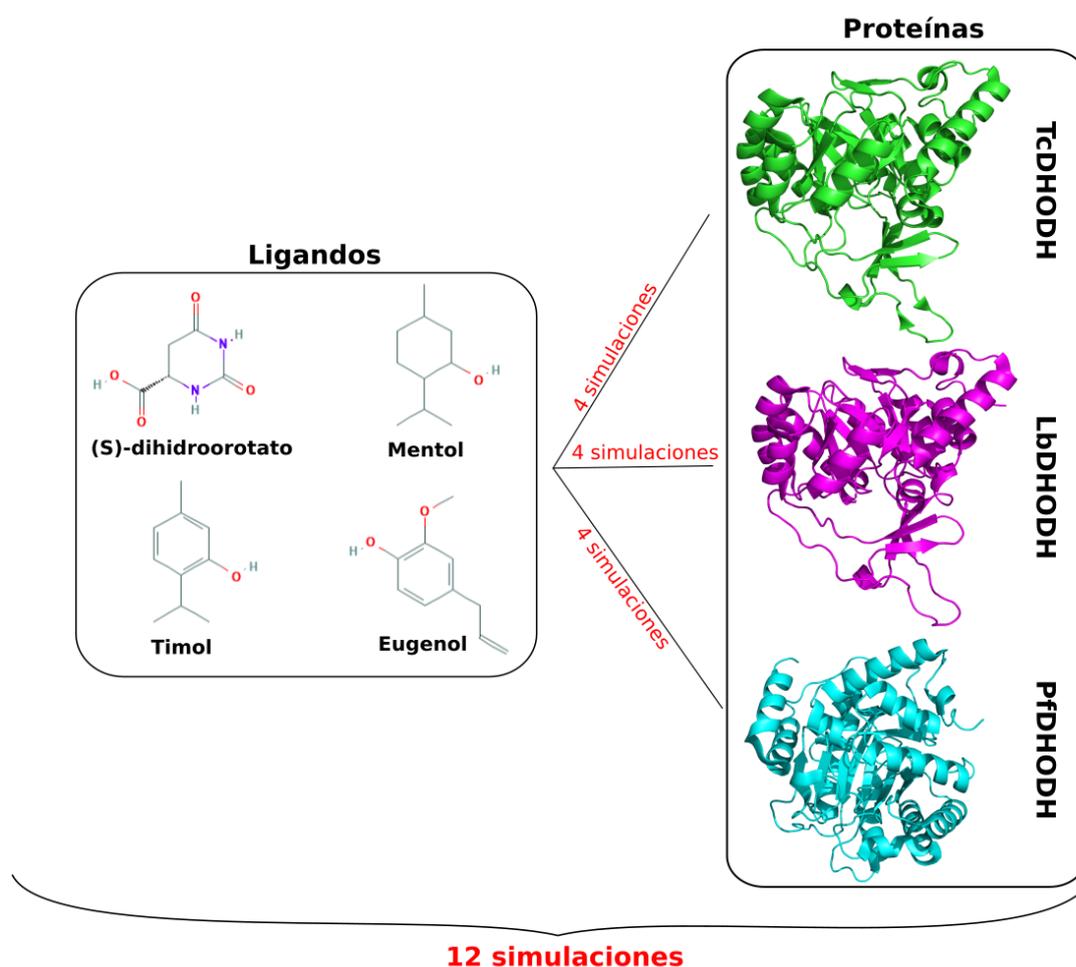


Figura 44. Esquema representativo de las 12 simulaciones realizadas.

Este tipo de experimentos *in silico* requiere de un alto costo computacional y aumenta a medida que simulamos sistemas más grandes y complejos. Las proteínas TcDHODH (PDB ID: 2E68), LbDHODH (PDB ID: 4WZH) y PfDHODH (PDB ID: 4CQA) fueron cristalizadas como homodímeros, este estado oligomérico está conformado por dos monómeros exactamente iguales y están unidos mediante interacciones proteína-proteína. Sin embargo, cada monómero contiene un sitio activo que es independiente del otro, es decir, que en forma de monómero también tiene actividad enzimática. Es por ello que a modo de reducir el sistema a simular se decidió realizar las simulaciones utilizando solo un monómero.

7.3.3.1. RMSD y RMSF

El análisis de RMSD se utiliza en los estudios de simulaciones de dinámica molecular para medir de forma cuantitativa la estabilidad del sistema que se está simulando a lo largo de toda la escala de tiempo simulada.

En este caso, los sistemas que simulamos son complejos proteína-ligando. Para poder analizar los resultados de RMSD, es importante saber que las proteínas en general, son sistemas metaestables, lo cual indica que el estado nativo de las proteínas, el de mínima energía, en realidad es un conjunto de diferentes conformaciones. Esto está directamente relacionado al concepto biofísico de frustración, el cual dice que las proteínas se pliegan minimizando sus conflictos energéticos (“Principio de mínima frustración”) [28]. Sin embargo, este principio dice que aún existen conflictos remanentes en la estructura, los cuales están relacionados a varias funciones biológicas [29-31]. Por lo tanto, se espera que los valores de RMSD sean siempre mayores a 0 debido a la propia dinámica natural de la proteína. Por otro lado, una gran fluctuación de los valores de RMSD se interpreta como señal de que la simulación no está equilibrada ni estable [32].

En la Figura 45A-C, se muestra el RMSD calculado sobre los átomos $C\alpha$ de la estructura de la proteína por cada complejo simulado: sustrato natural (amarillo), Mentol (rojo), Timol (azul) y Eugenol (verde). Se observa que para todas las proteínas el RMSD es bajo y el esperado, por lo mencionado anteriormente, esto nos estaría indicando que todas las proteínas están en equilibrio y son estables durante los 120 ns de la simulación. Este hallazgo sugiere que el contacto con dichos ligandos no generó un cambio extremo en la estructura de la proteína, sino que los complejos formados fueron estables.

El promedio de los RMSD correspondiente a la estructura de las proteínas durante los 120 ns fue dentro del rango de 0,99 Å a 1,61 Å lo que ratifica que son complejos estables ya que se considera, en las simulaciones de dinámica molecular, un RMSD aceptable en un orden de 1-3 Å para proteínas pequeñas y globulares como lo es DHODH (Tabla 20) [33]. De manera global, debido a los promedios de RMSD obtenidos de las estructuras de las proteínas, se puede inferir que los compuestos de interés se encuentran estables en el sitio de unión del sustrato en la conformación estructural de las proteínas en el mismo orden que el sustrato natural.

Además de calcular el RMSD de las proteínas en complejo, también calculamos el RMSD de los ligandos con la finalidad de analizar la estabilidad del Mentol, Timol, Eugenol y el sustrato natural durante el período de simulación dentro del sitio de unión al sustrato. Una rápida fluctuación de los valores de RMSD de un ligando indica que el ligando prefiere moverse más en la proteína durante la simulación y no quedarse en un mismo sitio. Si un ligando fluctúa mucho genera más contactos con diferentes residuos de la proteína pero menos estables; caso contrario, si permanece más tiempo en un sitio el ligando generará siempre interacciones con los mismos residuos de la proteína siendo estas interacciones más estables (Tabla 20).

Como se muestra en la Figura 45 D-F y en los promedios de RMSD en la Tabla 20, los ligandos en los complejos con PfdHODH fueron más estables y fluctuaron menos durante la simulación, en comparación con los complejos de TcdHODH y LbdHODH. Esto sugiere que los ligandos en el complejo con PfdHODH son relativamente más estables y permanecen durante la simulación en un mismo sitio, lo que permitiría generar interacciones más continuas con los residuos propios de ese sitio. También se observó que el Eugenol, comparado con los demás ligandos, fue el ligando que más fluctuó en todos los complejos. Este comportamiento puede deberse a la diferencia de la estructura química del Eugenol en comparación con el Mentol y Timol, sugiriendo que estructuras más pequeñas fluctúan menos y permanecen más estables en el sitio de unión al sustrato de la DHODH.

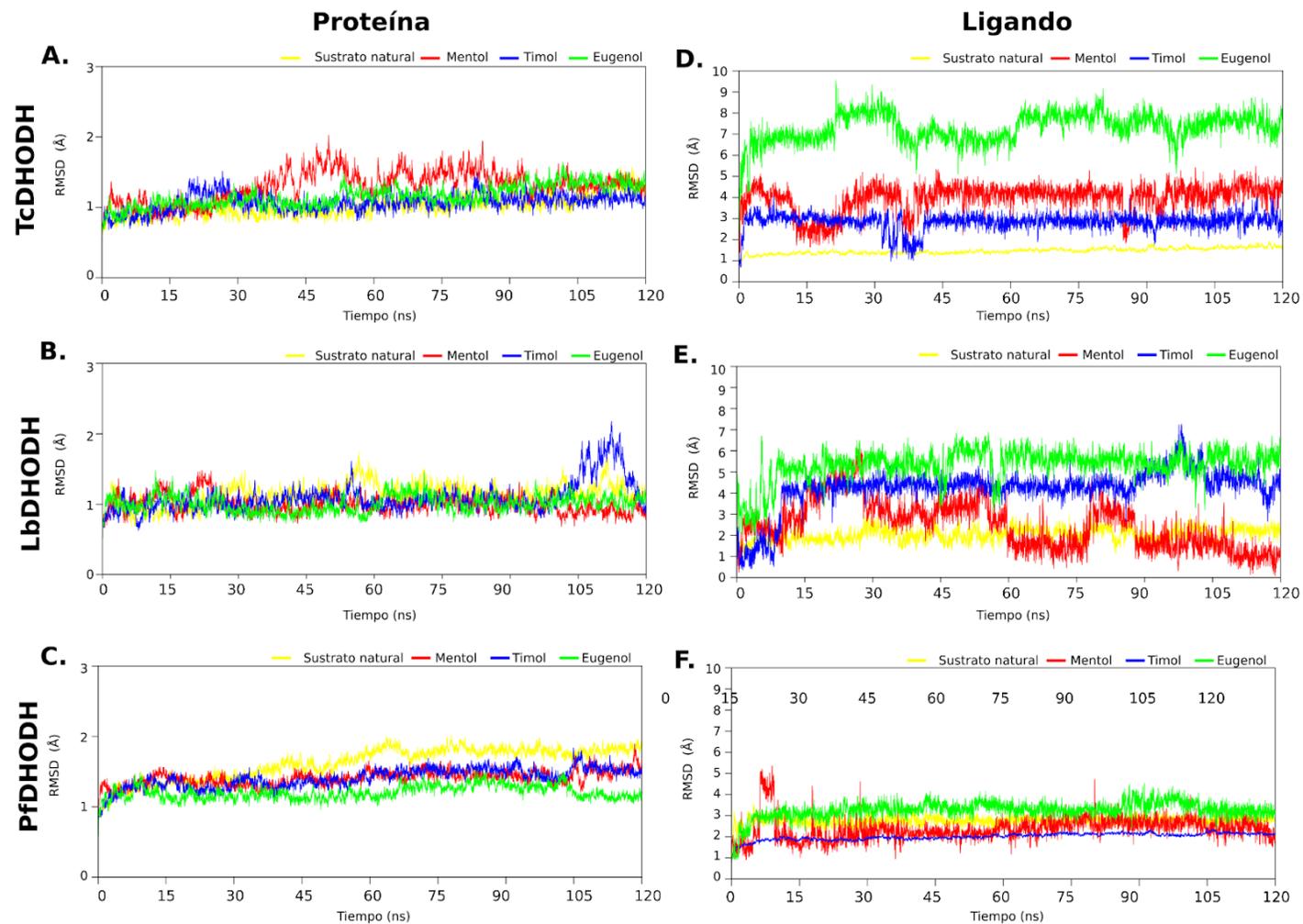


Figura 45. RMSD del *backbone* de las proteínas y de los ligandos en complejos simulados. En amarillo corresponde al complejo con el sustrato natural (S-dihidroorotato), en rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

Tabla 20. Valores del promedio de RMSD del *backbone* de la proteína y ligando.

Compuestos	RMSD promedio					
	<i>Backbone</i> de la proteína			Ligando		
	TcDHODH	LbDHODH	PfDHODH	TcDHODH	LbDHODH	PfDHODH
Sustrato natural	1,01	1,13	1,61	1,46	2,02	2,76
Mentol	1,29	0,99	3,95	3,95	2,50	2,37
Timol	1,06	1,09	2,84	2,84	4,23	2,00
Eugenol	1,15	1,00	7,30	7,30	5,33	3,26

El RMSF (del inglés, *Root Mean Square Fluctuation*) es un parámetro útil para identificar los residuos o regiones flexibles en la proteína. A partir de la Figura 46A-C podemos deducir que los residuos de las proteínas TcDHODH, LbDHODH y PfDHODH tienen un perfil de fluctuación similar, tanto con el ligando natural como con nuestras moléculas de interés.

Esta similitud en los perfiles de los gráficos RMSF indica que para los diferentes ligandos no se tuvo un efecto diferente y significativo en la flexibilidad general de la proteína en todas las simulaciones. Sin embargo, es interesante observar una diferencia visible en dos regiones de la proteína PfDHODH (Figura 46-C, identificado con flechas), en las cuales estas regiones poseen mayor flexibilidad con el sustrato natural que con Mentol, Timol y Eugenol.

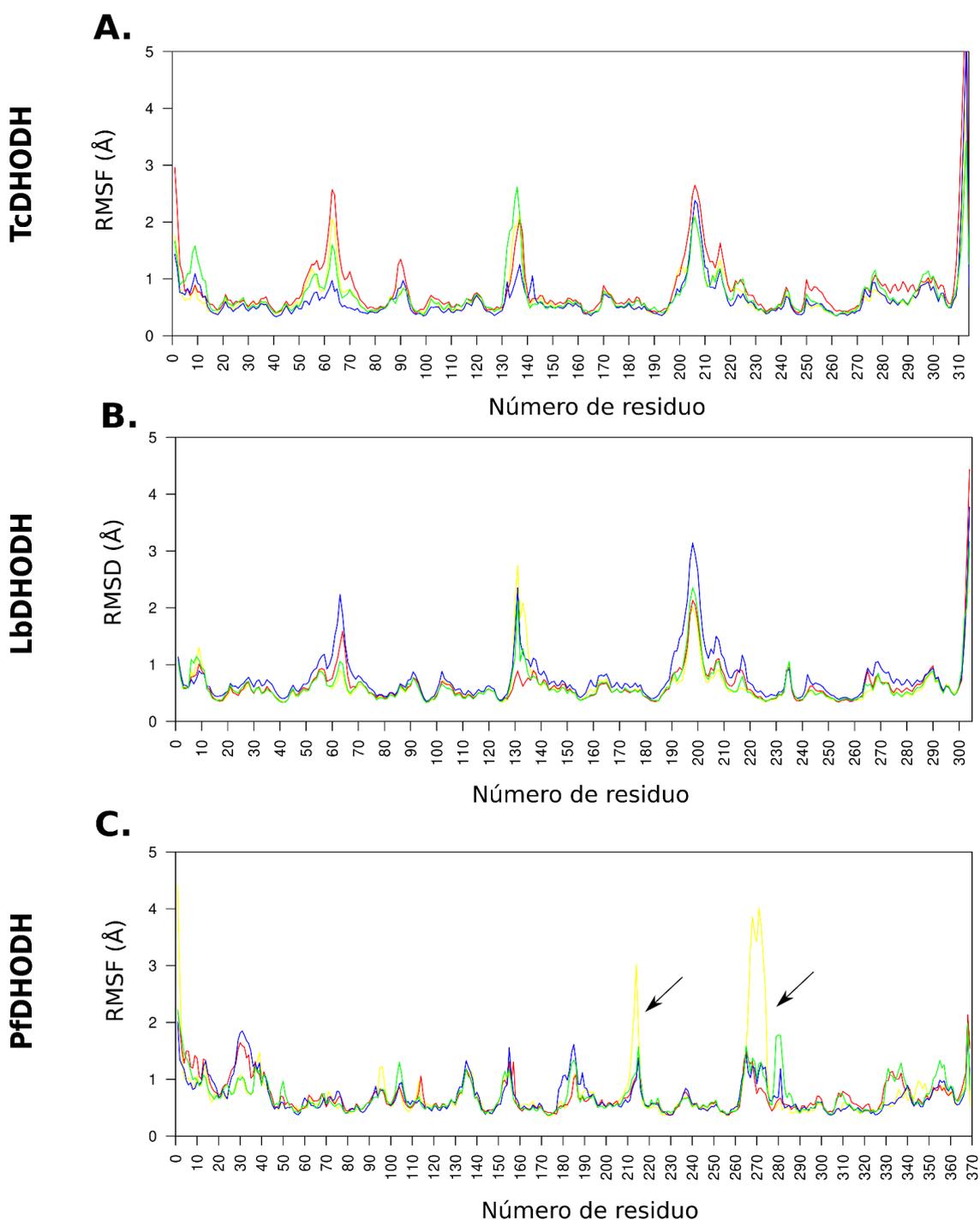


Figura 46. RMSF del *backbone* de las proteínas en complejo simuladas. En amarillo corresponde al complejo con el sustrato natural (S-dihidroorotato), en rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

7.3.3.2. Cálculos de energía libre de unión

La estabilidad de un complejo proteína-ligando se puede cuantificar recurriendo a los principios básicos de la física usando modelos clásicos, mecánica de Newton, o cuánticos. Dado que los cálculos moleculares basados en mecánica cuántica son muy costosos, y sobre todo para sistemas con un elevado número de átomos (como los complejos proteína-ligando

que son de nuestro interés), la mecánica clásica es el método de uso común en los cálculos de energías de interacción entre la proteína y el ligando. Cuando se produce la unión entre el ligando y el sitio de interés de la proteína se establecen una serie de interacciones específicas que son las responsables de la estabilidad total del complejo. Debido a que es de interés conocer la afinidad de unión del Mentol, Timol y Eugenol a TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH realizamos cálculos de energía libre de unión durante toda la simulación a través del enfoque de Mecánica Molecular de Superficie de Poisson Boltzmann (MM-PBSA, ver métodos).

Es importante mencionar que mientras más negativo sea el valor de la energía de unión indica una mayor afinidad de unión del ligando con la proteína. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 21. Como se muestra, tanto el valor del sustrato natural como los compuestos de interés tienen una energía de unión ($\Delta G_{unión}$) favorable sobre TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH.

De manera global destacamos que los complejos generados con PfdDHODH obtuvieron un valor de energía de unión mayor que en las demás proteínas. Esto nos indicaría que estas moléculas presentan mayor afinidad de unión al sitio del sustrato de PfdDHODH que de TcDHODH y LbDHODH, pero no mayor que el sustrato natural.

A su vez, se observó que el Mentol y Eugenol obtuvieron una energía de enlace de unión más favorable que el sustrato natural en TcDHODH. Este comportamiento también se observa con el Eugenol en LbDHODH. Estas dos observaciones pueden indicar que estos compuestos podrían competir con la unión del sustrato natural en dichas proteínas.

También analizamos varios componentes de la energía libre de unión para identificar los mecanismos de interacción de dichas moléculas con el sitio de unión al sustrato, así como las interacciones pertinentes que explican principalmente su especificidad de unión. En todos los complejos la energía de interacciones intermoleculares en la fase gaseosa (solvatación no polar) fue la contribución más importante de la unión. También se registraron en todos los casos interacciones favorables con respecto a la energía de van der Waals, y en menor medida la energía electrostática. Por otro lado, dichas contribuciones favorables fueron contrarrestadas por la energía de solvatación polar.

Tabla 21 Perfil de energía de unión de los ligandos a TcDHODH, LbDHODH y PfdHODH basado en MM-PBSA.

Ligandos	Componentes energéticos (kcal/mol)				
	TcDHODH				
	ΔE_{vdw}	ΔEle	ΔG_{gas}	ΔG_{sol}	$\Delta G_{unión}$
Sustrato natural	-17,41 ± 2,00	-17,18 ± 3,94	-34,60 ± 4,46	25,42 ± 4,22	-9,17 ± 3,44
Mentol	-22,33 ± 1,44	-4,65 ± 3,45	-26,99 ± 2,54	16,37 ± 3,42	-10,62 ± 3,63
Timol	-19,99 ± 1,46	-1,56 ± 0,85	-21,56 ± 1,87	18,69 ± 2,27	-2,86 ± 0,39
Eugenol	-24,91 ± 1,60	-10,03 ± 1,64	-34,95 ± 2,31	20,76 ± 2,09	-14,18 ± 2,34
LbDHODH					
Sustrato natural	-20,44 ± 1,98	-27,20 ± 3,18	-47,65 ± 3,05	33,76 ± 2,21	-13,88 ± 0,34
Mentol	-26,22 ± 1,23	-1,45 ± 0,73	-27,68 ± 1,49	19,19 ± 276	-8,48 ± 2,62
Timol	-24,12 ± 1,26	-7,38 ± 2,21	-31,51 ± 2,45	22,23 ± 2,90	-9,27 ± 2,37
Eugenol	-24,36 ± 1,94	-21,49 ± 2,63	-45,86 ± 2,97	31,32 ± 2,74	-14,54 ± 3,24
PfdHODH					
Sustrato natural	-18,63 ± 2,98	-60,50 ± 5,21	-79,14 ± 4,00	50,44 ± 2,69	-28,69 ± 3,65
Mentol	-26,58 ± 1,83	-13,65 ± 1,54	-40,23 ± 1,85	19,13 ± 1,74	-21,10 ± 2,06
Timol	-23,30 ± 1,85	-8,04 ± 4,64	-31,35 ± 4,51	13,59 ± 2,19	-17,75 ± 2,78
Eugenol	-29,41 ± 2,05	-7,17 ± 2,07	-36,59 ± 2,39	24,14 ± 1,91	-15,44 ± 2,98

ΔE_{vdw} : Energía de van der Waals.

ΔEle : Energía electrostática.

ΔG_{gas} : Energía libre en fase gaseosa.

ΔG_{sol} : Energía libre de solvatación.

$\Delta G_{unión}$: Energía libre de enlace total.

Todas las interacciones a tener en cuenta en un sistema proteína-ligando tienen lugar en un medio acuoso. Cuando las moléculas están aisladas en disolución, están completamente rodeadas de moléculas de agua. Sin embargo, cuando se produce la unión proteína-ligando muchas de estas moléculas de agua son desplazadas. Se observó que este desplazamiento conlleva un gasto energético grande en nuestras moléculas, pero fue contrarrestado por las demás interacciones formadas.

7.3.3.3. Contribución energética de los residuos implicados en la unión ligando-proteína.

Para explorar la contribución energética de los residuos individuales de cada proteína frente a la unión de cada molécula, realizamos una descomposición de energía calculada a través de los estudios de MM-PBSA en los 120 ns de simulación. La contribución energética de cada residuo en todos los complejos se muestra en la Figura 47. De forma general, observamos que los residuos de todos los complejos presentan mayoritariamente contribuciones individuales favorables a la energía libre de unión de cada complejo. Las principales interacciones favorables se originaron predominantemente en los residuos que aportaron energías de unión superiores a -0,5 kcal/mol.

Complejos con TcDHODH:

- Mentol: Ala19 (-0,72 kcal/mol), Leu22 (-0,65 kcal/mol), Ser195 (-0,80 kcal/mol) y Ala273 (-0,73 kcal/mol).
- Timol: Ala19 (-1,13 kcal/mol), Leu22 (-0,71 kcal/mol), Gly271 (-0,64kcal/mol) y Ala273 (-0,87 kcal/mol).
- Eugenol: Ser195 (-0,65kcal/mol), Gly221 (-0,69 kcal/mol), Gly222 (-0,62 kcal/mol), Ile225 (-1,16 kcal/mol) y Leu226 (-0,59 kcal/mol).

Del complejo con TcDHODH hallamos que las contribuciones energéticas predominantes del Mentol y Timol fueron con los residuos implicados en el sitio de unión al sustrato, mientras que el Eugenol obtuvo una contribución mayor en sitios de unión al cofactor FMN [16, 34-36]. Destacamos las contribuciones del Mentol y del Eugenol con Ser195 ya que es un residuo en el cual se caracteriza como un residuo que a través su interacción logran inhibir a la proteína [37].

Complejos con LbdHODH:

- Mentol: Ala19 (-0,82 kcal/mol), Val22 (-1,14 kcal/mol) y Thr273 (-0,80 kcal/mol).
- Timol: Gly223 (-0,91 kcal/mol), Val226 (-0,92 kcal/mol) y Phe227 (-0,58 kcal/mol).

- Eugenol: Gly222 (-0,71 kcal/mol), Gly223 (-0,78 kcal/mol), Val226 (-0,95 kcal/mol), Gly250 (-0,82 kcal/mol), Gly251 (-0,84 kcal/mol) y Thr273 (-2,89 kcal/mol).

Con respecto al complejo con LbDHODH, observamos que con el Mentol hubo contribuciones energéticas favorables en los residuos implicados en el sitio de unión al sustrato, mientras que para los complejos con Timol y Eugenol las contribuciones energéticas más favorables predominaron en residuos que conforman el sitio de unión al cofactor FMN [38-39].

Complejos con PfdHODH:

- Mentol: Leu172 (-1,03 kcal/mol), Phe188 (-0,91 kcal/mol), Ile272 (-0,93 kcal/mol), Ser529 (-1,32 kcal/mol) y Val532 (-1,29 kcal/mol).
- Timol: Leu176 (-0,56 kcal/mol), Gly181 (-1,55 kcal/mol), His185 (-1,52 kcal/mol), Phe188 (-0,92 kcal/mol), Phe227 (-1,63 kcal/mol), Ile263 (-0,94 kcal/mol) Val532 (-1,07 kcal/mol).
- Eugenol: Ala224 (-0,58 kcal/mol), Phe278 (-0,52 kcal/mol), Ser345 (-0,91 kcal/mol), Lys429 (-2,41 kcal/mol), Asn458 (-0,86 kcal/mol), Thr459 (-0,98 kcal/mol), Ser505 (-0,58 kcal/mol) y Thr528 (-1,46 kcal/mol).

En cuanto al complejo de los compuestos con PfdHODH, identificamos que las interacciones tanto del Mentol, Timol como el Eugenol generaron contribuciones energéticas favorables con residuos implicados en la interacción del sustrato natural y del cofactor FMN. A diferencia de TcdHODH y LbdHODH, esta proteína es un blanco terapéutico más conocido y estudiado, habiendo permitido que investigadores logren sintetizar y cristalizar varios inhibidores específicos de PfdHODH.

A partir de estas investigaciones, se lograron identificar cuales son los residuos que interactúan con estas moléculas de actividad inhibitoria comprobadas [40-45]. Comparando estos residuos ya caracterizados con los residuos con contribuciones energéticas favorables se destacan; del complejo con Mentol los residuos Leu172 y Phe188; del complejo con Timol los residuos Leu176, Gly181, His185, Phe188, Phe227, Ile263 y Val532; por último, del complejo con Eugenol se destaca los residuos Phe278 y Ser345.

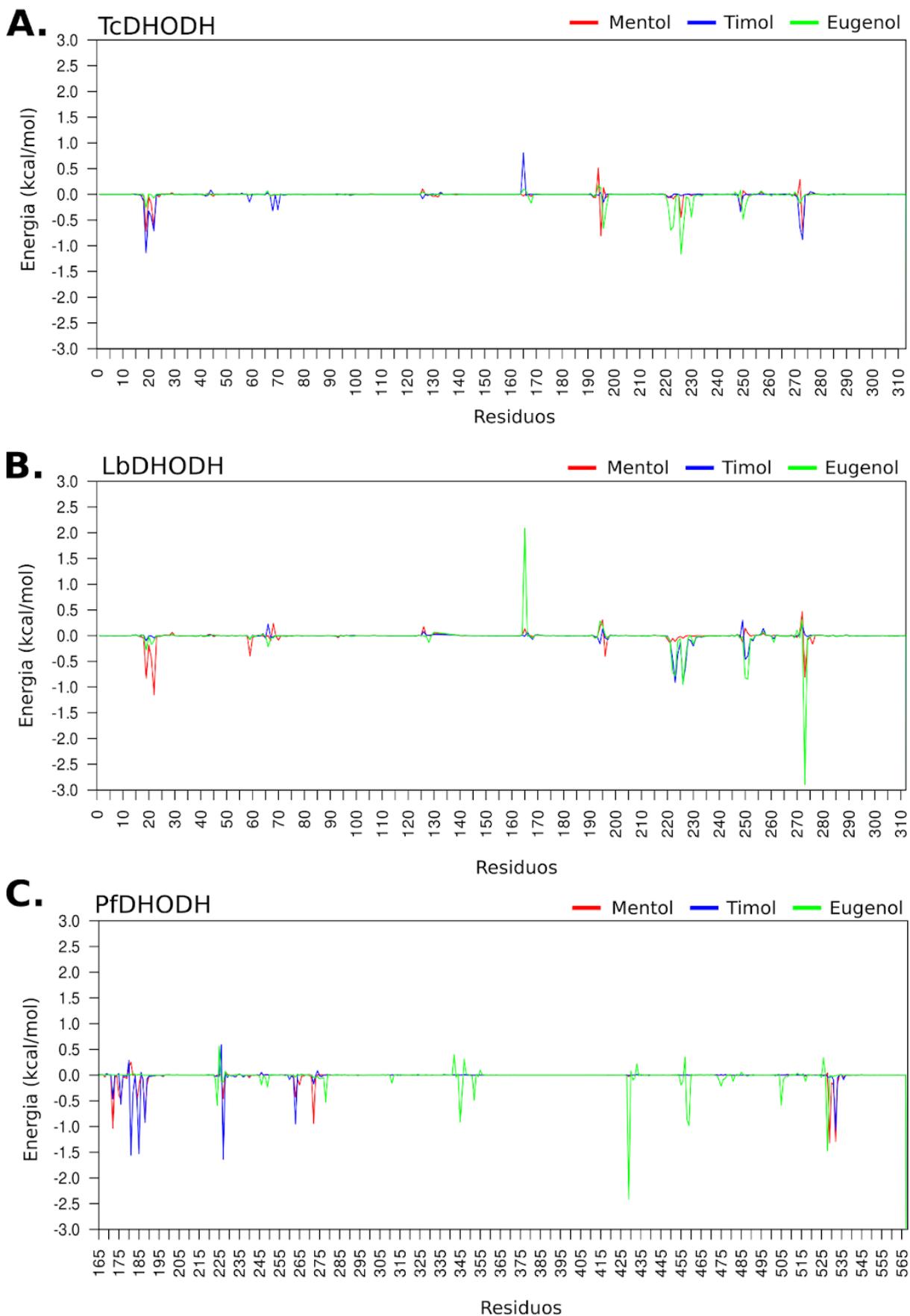


Figura 47. Contribución energética por residuo. **A.** TcDHODH **B.** LbDHODH **C.** PfDHODH. En rojo con Mentol, en azul con Timol y en verde con Eugenol.

El complejo con Timol, comparado con los complejos del Mentol y Eugenol, presenta mayores interacciones con residuos en los que ya se comprobó que su interacción llevaba a una inhibición enzimática de la proteína. A su vez, se considera importante destacar que si bien el Eugenol no genera numerosos contactos con residuos de interés genera interacción con el residuo Ser345, residuo ya reportado como residuo catalítico teniendo un rol fundamental en la actividad redox de la proteína [46].

7.4. Discusión

Las pirimidinas se sintetizan tanto a través de la biosíntesis *de novo* como por vías de rescate; sin embargo, los organismos parasitarios carecen de las vías de rescate para los nucleótidos de pirimidina, por lo que el bloqueo de la biosíntesis *de novo* se considera un blanco terapéutico atractivo para el diseño de fármacos con la finalidad de atacar selectivamente al parásito sin afectar al huésped humano. La biosíntesis *de novo* de las pirimidinas representa uno de los primeros procesos metabólicos de la célula, la misma consta de seis pasos que han permanecido intactos durante la evolución [8]. La dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) es la única proteína enzimática redox de las seis que componen la biosíntesis *de novo*. Diversas pruebas obtenidas de una variedad de protozoos parasitarios sugieren que la inhibición de dicha proteína es un mecanismo de acción atractivo y prometedor para el diseño de nuevos fármacos antiparasitarios [8, 18, 44, 47-50].

Dentro de las actividades desarrolladas en este trabajo de Tesis, pudimos corroborar a través de estudios *in vitro* fenotípicos la eficacia de las moléculas de Mentol, Timol y Eugenol mediante el diseño de prodrogas frente a *T. cruzi*, *L. braziliensis* y *P. falciparum*. Sin embargo, el modo de acción de dichos compuestos aún no fue elucidado.

Diversas investigaciones sostienen que los compuestos naturales como los terpenoides, que poseen estructuras similares a los sustratos de las enzimas en las vías biosintéticas de los parásitos, muestran propiedades parasitarias inhibitorias [22-24, 51]. Partiendo de estos hallazgos, en este Capítulo predecimos que el Mentol, Timol y Eugenol podrían ser sustrato de la dihidroorotato deshidrogenasa de *T. cruzi*, *L. braziliensis* y *P. falciparum*.

Del análisis de secuencia y de estructura realizado, se pudo identificar que las proteínas TcDHODH y LbDHODH presentan un alto porcentaje de identidad de secuencia y de estructura, mientras que esto no sucede con PfDHODH. Estas diferencias identificadas sustentan a la clasificación de diversos autores en la que clasifican a TcDHODH y LbDHODH como DHODH de Clase 1A y a PfDHODH como DHODH Clase 2 [14-17].

Se logró validar y realizar un acoplamiento molecular satisfactorio con el software AutodockVina, un programa de bajo costo computacional y de código abierto, entre las moléculas y proteínas de interés. Partiendo de los complejos proteína-ligando generados se realizaron doce simulaciones de dinámica molecular de 120 ns, en la cual se simuló cada proteína con su sustrato natural con la finalidad de poder realizar comparaciones a posteriori.

Como se observó en los cálculos RMSD y RMSF todos los complejos simulados generaron una conformación estable en los 120 ns de trayectoria simulada, donde no se halló una diferencia significativa entre las moléculas de interés y el sustrato natural. Que el complejo se haya mantenido estable a lo largo de toda la simulación indica que todo el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico, por lo tanto esto es energéticamente favorable.

Dichas conformaciones estables permitieron generar globalmente interacciones energéticas favorables entre los residuos de las proteínas y los átomos del Mentol, Timol y Eugenol. En particular, se observó que los ligandos no sólo se localizaron en el sitio de unión al sustrato y del cofactor FMN, sino que permanecieron en dichos sitios durante toda la simulación realizada. Es decir que los ligandos prefieren unirse en estos sitios y no a otra región de la proteína. Esta observación se sustenta con los resultados favorables de energía libre de unión obtenidos del proceso de unión de cada ligando con las proteínas. Se considera que los resultados alcanzados tienen base en la similitud estructural de dichos compuestos con el sustrato natural y el cofactor de la dihidroorotato deshidrogenasa.

A diferencia de LbDHODH, ya se ha logrado cristalizar moléculas que inhiban la actividad enzimática de TcDHODH y PfdDHODH. Al cristalizarse un inhibidor junto con la proteína es posible identificar cuales son los residuos de la proteína que interactúan con dicho inhibidor y así poder conocer cuáles son los residuos implicados para la posible inhibición. De esta manera, se logró identificar residuos que interaccionarían con Mentol, Timol y Eugenol implicados en la inhibición de la proteína, esto implicaría que estas moléculas además de tener energías de unión favorable presentan interacciones con residuos que podrían llevar a la inhibición enzimática de TcDHODH y PfdDHODH.

7.5. Conclusiones parciales

Concluimos que el Mentol, Timol y Eugenol podrían interactuar en el sitio de unión del sustrato de TcDHODH, LbDHODH y PfdDHODH, y lograr generar un cambio en su actividad enzimática. Estos resultados sirvieron como base para en un futuro realizar ensayos enzimáticos específicos *in vitro*.

7.6. Sección experimental

Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos computacionales del Centro de Computación de Alto Desempeño (CCAD) de la Universidad Nacional de Córdoba (<https://ccad.unc.edu.ar/>), que forman parte del SNCAD del MinCyT de la República Argentina.

7.6.1. Análisis de la secuencia y estructura de TcDHODH, LbDHODH y PfDHODH

Para el análisis de secuencia se descargaron las secuencias (archivo FASTA) de cada proteína desde PDB (<https://www.rcsb.org/>), luego se realizó el alineamiento múltiple de secuencia con la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para el alineamiento estructural se utilizó la herramienta TopMatch (<https://topmatch.services.came.sbg.ac.at/>) [52].

7.6.2. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (o *molecular docking*) consta en encontrar la posición, orientación y conformación (pose) más favorables para la unión de una molécula, por ejemplo, una proteína objetivo, asignando una puntuación que es la estimación de la probabilidad de unión de cada molécula para cada pose [53].

7.6.2.1. Preparación de ligandos

Las estructuras 2D del Mentol, Timol y Eugenol se descargaron de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) en formato SDF y luego se convirtieron a formato PDB utilizando el software Open Babel [54]. Con las herramientas del software AutoDockTools4 [25] se adicionaron átomos de hidrógeno a los ligandos, se minimizó la energía y se convirtió al formato pdbqt para su posterior análisis.

7.6.2.2. Preparación de proteínas

Todas las proteínas se obtuvieron de Protein Data Bank [55] (PDB, <http://www.rcsb.org/>). Las proteínas seleccionadas fueron *Trypanosoma cruzi* dihidroorotato deshidrogenasa (TcDHODH, PDB: 2E68/Cadena B), *Leishmania braziliensis* dihidroorotato deshidrogenasa (LbDHODH, PDB: 4WZH/Cadena B) y *Plasmodium falciparum* dihidroorotato deshidrogenasa (PfDHODH, PDB: 4CQA/Cadena B). Todas las moléculas que no forman parte de la estructura de la proteína fueron eliminadas. Se añadieron átomos de hidrógeno a las proteínas y se convirtieron a formato pdbqt utilizando las herramientas del software AutoDockTools4 [25] para su posterior análisis.

7.6.2.3. Acoplamiento molecular y visualización

Para la búsqueda conformacional del ligando energéticamente más favorable se utilizó Autodock Vina [25], donde se realizó un acoplamiento de proteína rígida y de ligando flexible con una exhaustividad máxima de 20 para el acoplamiento proteína-ligando. Se identificó la ubicación de los residuos catalíticos de cada proteína a partir de las anotaciones de UniProtKB [56] y del Atlas del sitio catalítico [59]. El tamaño de la caja fue: $50 \times 50 \times 50$ Å para todos los acoplamientos. Para el análisis de la visualización 3D se utilizó PyMol .

7.6.2.4. RMSD

El RMSD para realizar la validación de AutodockVina se realizó según la ecuación 13, donde $x_{1,i}$ corresponde al átomo "i" de la estructura del ligando cristalizado, $x_{2,i}$ corresponde al átomo "i" de la estructura del ligando predicho por AutodockVina y n es el número total de átomos.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{1,i} - x_{2,i})^2}{n}} \quad \text{ec. 13}$$

7.6.3. Simulaciones de dinámica molecular

La dinámica molecular (DM) es una de las principales herramientas para el estudio de biomoléculas. Las simulaciones de DM permiten el estudio de procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos tales como; estabilidad de proteínas, cambios conformacionales, reconocimiento molecular de biomoléculas, transporte de iones, etc. Es una herramienta teórica clave en el desarrollo de nuevos fármacos [59]. Actualmente, existen reconocidos programas para realizar simulaciones de DM tales como AMBER [60], NAMD [61] y GROMACS [62]. Estos programas utilizan técnicas de paralelización para optimizar el tiempo de cálculo.

7.6.3.1. Programas para dinámica molecular utilizados

- AMBER20 (*Assisted Model Building with Energy Refinement*): es un paquete de software de dinámica molecular que simula un amplio número de campos de fuerza [60].
- LEaP prepara archivos de entrada para los programas de simulación.

- Antechamber automatiza el proceso de parametrización de pequeñas moléculas orgánicas utilizando GAFF (General AMBER force field) que proporciona las cargas calculadas previamente por cálculos cuánticos.
- Pmemd es el programa de simulación central y proporciona instalaciones para minimizar la energía y la dinámica molecular con una amplia variedad de opciones. Fue diseñado para el cómputo en paralelo. pmemd.cuda ejecuta simulaciones en PC con unidades de procesamiento de gráficos (GPU).
- cptraj analiza numéricamente los resultados de simulación.
- MM-PBSA permite cálculos de solventes implícitos en instantáneas de simulaciones de dinámica molecular permitiendo calcular energías libres de ligado con el modelo de Poisson Boltzman.

Todas las simulaciones se partieron del complejo resultante del acoplamiento molecular de menor energía de unión. La parametrización de la proteína, sus minimizaciones y dinámicas se realizaron mediante el empleo de las herramientas de AMBER20. El armado de la topología de este sistema se desarrolló con la herramienta tleap del paquete AMBER20. El campo de fuerza utilizado fue el ff14SB. La proteína fue inmersa en una caja cúbica, solvatada con moléculas de agua del modelo TIP3P y el sistema fue neutralizado con contraiones Cl⁻.

Todos los pasos de minimización y dinámica se realizaron en GPUs mediante pmemd.cuda haciendo uso de la placa GPU NVIDIA® GTX 1080Ti.

La minimización inicial contó con un primer paso en el que sólo se minimizó el solvente, manteniendo restringida la estructura proteica. A partir de esta instancia, se procedió a minimizar el sistema molecular completo con un número máximo de 8000 ciclos de minimización de gradiente conjugado. Luego, se continuó con el fin de equilibrar el sistema, realizando un calentamiento lento a lo largo de 30 ps mediante termostato de Langevin, sin escala de presión y a volumen constante, incluyendo un número de 1 ns de dinámica molecular y con un paso de integración de 0,002 ps. Posteriormente, se agregó una etapa de producción de 120 ns con paso de integración de 0,002 ps. El análisis de las trayectorias (RMSD y enlaces de hidrógeno) se elaboró con la herramienta del AMBER20, cptraj. El paquete del VMD también fue utilizado para la visualización y la representación de los gráficos, evaluando RMSD de los átomos del *backbone* a lo largo de toda la simulación.

7.6.3.2. RMSD y RMSF

El RMSD para la dinámica molecular se calcula para todas las frames de la trayectoria (entiéndase a frames como cada foto o instante que constituyen a la película final de la trayectoria obtenida). El cálculo de RMSD para cada frame (x) se calcula según la ecuación 14, donde N es el número de átomos; t_{ref} es el tiempo de referencia (normalmente se utiliza la primera frame como referencia y se considera como tiempo $t=0$); y r' es la posición de los átomos seleccionados en la frame x después de superponerlo con la frame de referencia, donde la frame x se registra en el tiempo t_x . El procedimiento se repite para cada frame de la trayectoria de la simulación.

$$RMSD_x: \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2} \quad \text{ec. 14}$$

El RMSD es útil para analizar los movimientos de la estructura de la proteína a lo largo de un período de tiempo.

El RMSF es una medida numérica similar a la RMSD, pero en lugar de indicar las diferencias de posición entre estructuras enteras a lo largo del tiempo, calcula de la flexibilidad individual de los residuos, o de cuánto se mueve (fluctúa) un residuo concreto durante una simulación. Se calcula según la ecuación 15, donde x_i son las coordenadas de la partícula i , y $\langle x_i \rangle$ es la posición media del conjunto de i .

$$RMSF = \sqrt{(x_i - \langle x_i \rangle)^2} \quad \text{ec. 15}$$

Tanto RMSD como RMSF fueron calculados con el módulo cptraj, que es parte del software AmberTools [20].

7.6.3.3. Cálculos de energía libre de unión

Las estimaciones de la energía de unión de las moléculas al sitio del sustrato se llevaron a cabo utilizando el enfoque de Mecánica Molecular de Superficie de Poisson Boltzmann [64-65]. Este método ayuda a predecir las energías implicadas en la formación del complejo, siendo útil para determinar la fuerza de unión y la afinidad de los respectivos compuestos hacia TcDHODH, LbDHODH y PfdHODH. Las estimaciones de la energía libre de unión se llevaron a cabo con 4000 frames resultantes de la simulación final de 120 ns en la que los sistemas mostraron estabilidad estructural. Matemáticamente, la energía libre de unión se representa mediante las ecuaciones 16-20.

$$\Delta G_{union} = G_{complejo} - (G_{receptor} + G_{ligando}) \quad \text{ec. 16}$$

$$\Delta G_{union} = \Delta G_{gas} + \Delta G_{sol} - T\Delta S = \Delta H - T\Delta S \quad \text{ec. 17}$$

$$\Delta G_{gas} = \Delta E_{int} + \Delta E_{ele} + \Delta E_{vdW} \quad \text{ec. 18}$$

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{ele, sol(PB)} - \Delta G_{np, sol} \quad \text{ec. 19}$$

$$\Delta G_{np, sol} = \gamma SASA + \beta \quad \text{ec. 20}$$

ΔG_{gas} representa la energía de la fase gaseosa, que se define como la suma de las energías interna (ΔE_{int}), electrostática (ΔE_{ele}) y de van der Waals (ΔE_{vdW}). La energía libre de solvatación se representa como ΔG_{sol} y se compone de dos componentes que son la contribución del término polar a la solvatación representada por $\Delta G_{ele, sol}$ y la contribución no polar a la solvatación ($\Delta G_{np, sol}$). $\Delta E_{ele, sol}$ se derivó mediante la estimación del modelo de Poisson-Boltzmann ($\Delta E_{ele, sol(PB)}$) utilizando el método MM-PBSA mientras que la determinación de la ($\Delta G_{np, sol}$) es según la ecuación 20 donde γ , la constante de proporcionalidad de la tensión superficial se establece en 0,0072 kcal/(mol⁻¹ Å⁻²) siendo β una constante. SASA, que representa el área superficial accesible del disolvente (Å²) se calcula utilizando un modelo de incorporación lineal de solapamientos por pares.

Los análisis de MM-PBSA se llevaron a cabo utilizando el script python MMPBSA.py [66] implementado en el paquete AMBER20, durante cada 2 ns de cada trayectoria (120 ns).

7.7. Bibliografía

- [1] B. L. Fina, M. Lombarte & A. Rigalli, “Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?”, 2013.
- [2] E. P. M. Leiva & D. A. Estrin, “Química computacional: Simulaciones matemáticas del comportamiento de átomos y moléculas”, 2011.
- [3] J. L. Medina-Franco, E. Fernández-de Gortari & J. J. Naveja, “Avances en el diseño de fármacos asistido por computadora”, *Educación química*, vol. 26, no. 3, pp. 180-186, 2015.
- [4] A. F. Combariza and G. Sastre, “Influence of zeolite surface in the sorption of methane from molecular dynamics”, *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no. 28, pp. 13751-13758, 2011.

- [5] A. F. Combariza, G. Sastre & A. Corma, "Molecular dynamics simulations of the diffusion of small chain hydrocarbons in 8-ring zeolites", *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, no. 4, pp. 875-884, 2011.
- [6] I. N. Levine, "Quantum chemistry", *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 7th Edition, 2014.
- [7] L. C. Pollitt, P. MacGregor, K. Matthews & S. E. Reece, "Malaria and trypanosome transmission: different parasites, same rules?", *Trends in parasitology*, vol. 27, no. 5, pp. 197-203, 2011.
- [8] D. Boschi, A. C. Pippione, S. Sainas & M. L. Lolli, "Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in anti-infective drug research", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 183, p. 111681, 2019.
- [9] P. M. Njogu, E. M. Guantai, E. Pavadai & K. Chibale, "Computer-aided drug discovery approaches against the tropical infectious diseases malaria, tuberculosis, trypanosomiasis, and Leishmaniasis", *ACS infectious diseases*, vol. 2, no. 1, pp. 8-31, 2016.
- [10] L. A. Chibli, T. J. Schmidt, M. C. Nonato, F. A. Calil & F. B. Da Costa, "Natural products as inhibitors of leishmania major dihydroorotate dehydrogenase", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 157, pp. 852-866, 2018.
- [11] P. Swaminathan & L. M. Saleena, "Development of specific dhodh inhibitors for plasmodium and human species", *International Journal of Computational Biology and Drug Design*, vol. 12, no. 1, pp. 1-15, 2019.
- [12] E. C. Webb *et al.*, Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. No. Ed. 6, *Academic Press*, 1992.
- [13] K. Tipton & A. McDonald, "A brief guide to enzyme nomenclature and classification", 2018.
- [14] R. A. Reis, F. A. Calil, P. R. Feliciano, M. P. Pinheiro & M. C. Nonato, "The dihydroorotate dehydrogenases: past and present", *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 632, pp. 175-191, 2017.
- [15] R. L. Fagan & B. A. Palfey, "Roles in binding and chemistry for conserved active site residues in the class 2 dihydroorotate dehydrogenase from escherichia coli", *Biochemistry*, vol. 48, no. 30, pp. 7169-7178, 2009.

- [16] M. P. Pinheiro, J. Iulek & M. C. Nonato, "Crystal structure of trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from γ strain", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 369, no. 3, pp. 812-817, 2008.
- [17] A. Singh, M. Maqbool, M. Mobashir & N. Hoda, "Dihydroorotate dehydrogenase: a drug target for the development of antimalarials", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 125, pp. 640-651, 2017.
- [18] T. Annoura, T. Nara, T. Makiuchi, T. Hashimoto & T. Aoki, "The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions", *Journal of molecular evolution*, vol. 60, no. 1, pp. 113-127, 2005.
- [19] M. Hashimoto, J. Morales, Y. Fukai, S. Suzuki, S. Takamiya, A. Tsubouchi, S. Inoue, M. Inoue, K. Kita, S. Harada, *et al.*, "Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for trypanosoma cruzi growth in the mammalian host cell cytoplasm", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 417, no. 3, pp. 1002-1006, 2012.
- [20] M. B. Isah, N. Tajuddeen, M. I. Umar, Z. A. Alhafiz, A. Mohammed & M. A. Ibrahim, "Terpenoids as emerging therapeutic agents: cellular targets and mechanisms of action against protozoan parasites", *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 59, pp. 227- 250, Elsevier, 2018.
- [21] J. Ellis, "Coenzyme q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack", *Parasitology Today*, vol. 10, no. 8, pp. 296-301, 1994.
- [22] H. R. Goulart, E. A. Kimura, V. J. Peres, A. S. Couto, F. A. A. Duarte & A. M. Katzin, "Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in plasmodium falciparum", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, no. 7, pp. 2502-2509, 2004.
- [23] I. C. Moura, G. Wunderlich, M. L. Uhrig, A. S. Couto, V. J. Peres, A. M. Katzin & E. A. Kimura, "Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in plasmodium falciparum", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45, no. 9, pp. 2553-2558, 2001.
- [24] D. C. Arruda, F. L. D'Alexandri, A. M. Katzin & S. R. Uliana, "Antileishmanial activity of the terpene nerolidol", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 49, no. 5, pp. 1679-1687, 2005.

- [25] O. Trott & A. J. Olson, “Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading”, *Journal of computational chemistry*, vol. 31, no. 2, pp. 455-461, 2010.
- [26] W. Forli, S. Halliday, R. Belew & A. J. Olson, “Autodock version 4.2”, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 55, no. 2, pp. 623-638, 2012.
- [27] D. R. Houston & M. D. Walkinshaw, “Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context”, *Journal of chemical information and modeling*, vol. 53, no. 2, pp. 384-390, 2013.
- [28] D. U. Ferreira, E. A. Komives & P. G. Wolynes, “Frustration in biomolecules”, *Quarterly reviews of biophysics*, vol. 47, no. 4, pp. 285-363, 2014.
- [29] D. U. Ferreira, J. A. Hegler, E. A. Komives & P. G. Wolynes, “Localizing frustration in native proteins and protein assemblies”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 50, pp. 19819-19824, 2007.
- [30] D. U. Ferreira, J. A. Hegler, E. A. Komives & P. G. Wolynes, “On the role of frustration in the energy landscapes of allosteric proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 9, pp. 3499-3503, 2011.
- [31] M. I. Freiberger, A. B. Guzovsky, P. G. Wolynes, R. G. Parra & D. U. Ferreira, “Local frustration around enzyme active sites”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 10, pp. 4037-4043, 2019.
- [32] W. Humphrey, A. Dalke & K. Schulten, “Vmd: visual molecular dynamics”, *Journal of molecular graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33-38, 1996.
- [33] M. Olivella, A. Gonzalez, L. Pardo & X. Deupi, “Relation between sequence and structure in membrane proteins”, *Bioinformatics*, vol. 29, no. 13, pp. 1589-1592, 2013.
- [34] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.-N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, *et al.*, “The genome sequence of trypanosoma cruzi, etiologic agent of chagas disease”, *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 409-415, 2005.
- [35] G. Gao, T. Nara, J. Nakajima-Shimada & T. Aoki, “Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosoma cruzi”, *Journal of molecular biology*, vol. 285, no. 1, pp. 149-161, 1999.

- [36] D. K. Inaoka, K. Sakamoto, H. Shimizu, T. Shiba, G. Kurisu, T. Nara, T. Aoki, K. Kita & S. Harada, "Structures of trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction", *Biochemistry*, vol. 47, no. 41, pp. 10881-10891, 2008.
- [37] J. Cheleski, J. R. Rocha, M. P. Pinheiro, H. J. Wiggers, A. B. da Silva, M. C. Nonato & C. A. Montanari, "Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1a inhibitors discovery", *European journal of medicinal chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 5899-5909, 2010.
- [38] C. S. Peacock, K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, *et al.*, "Comparative genomic analysis of three leishmania species that cause diverse human disease", *Nature genetics*, vol. 39, no. 7, pp. 839-847, 2007.
- [39] I. V. Ogungbe, W. R. Erwin & W. N. Setzer, "Antileishmanial phytochemical phenolics: molecular docking to potential protein targets", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 48, pp. 105-117, 2014.
- [40] L. V. Hoelz, F. A. Calil, M. C. Nonato, L. C. Pinheiro & N. Boechat, "Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase: A drug target against malaria", *Future medicinal chemistry*, vol. 10, no. 15, pp. 1853-1874, 2018.
- [41] M. L. Booker, C. M. Bastos, M. L. Kramer, R. H. Barker Jr, R. Skerlj, A. B. Sidhu, X. Deng, C. Celatka, J. F. Cortese, J. E. G. Bravo, *et al.*, "Novel inhibitors of plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with anti-malarial activity in the mouse model", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 43, pp. 33054-33064, 2010.
- [42] J. M. Coteron, M. Marco, J. Esquivias, X. Deng, K. L. White, J. White, M. Koltun, F. El Mazouni, S. Kokkonda, K. Katneni, *et al.*, "Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential", *Journal of medicinal chemistry*, vol. 54, no. 15, pp. 5540-5561, 2011.
- [43] S. Kokkonda, X. Deng, K. L. White, F. El Mazouni, J. White, D. M. Shackleford, K. Katneni, F. C. Chiu, H. Barker, J. McLaren, *et al.*, "Lead optimization of a pyrrole-based dihydroorotate dehydrogenase inhibitor series for the treatment of malaria", *Journal of medicinal chemistry*, vol. 63, no. 9, pp. 4929-4956, 2020.
- [44] X. Deng, R. Gujjar, F. El Mazouni, W. Kaminsky, N. A. Malmquist, E. J. Goldsmith, P. K. Rathod & M. A. Phillips, "Structural plasticity of malaria dihydroorotate dehydrogenase

allows selective binding of diverse chemical scaffolds”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 39, pp. 26999-27009, 2009.

[45] M. Thillainayagam, K. Malathi & S. Ramaiah, “In-silico molecular docking and simulation studies on novel chalcone and flavone hybrid derivatives with 1, 2, 3-triazole linkage as vital inhibitors of plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, vol. 36, no. 15, pp. 3993-4009, 2018.

[46] M. J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, *et al.*, “Genome sequence of the human malaria parasite plasmodium falciparum”, *Nature*, vol. 419, no. 6906, pp. 498-511, 2002.

[47] N. S. Carter, P. Yates, C. S. Arendt, J. M. Boitz & B. Ullman, “Purine and pyrimidine metabolism in leishmania”, *Drug targets in kinetoplastid parasites*, pp. 141-154, 2008.

[48] I. Sariago, T. Annoura, T. Nara, M. Hashimoto, A. Tsubouchi, K. Iizumi, T. Makiuchi, E. Murata, K. Kita & T. Aoki, “Genetic diversity and kinetic properties of trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase isoforms”, *Parasitology international*, vol. 55, no. 1, pp. 11-16, 2006.

[49] M. A. Phillips, “Antimalarial agents targeting nucleotide synthesis and electron transport: insight from structural biology”, *Neglected Diseases and Drug Discovery*, pp. 65-87, RCS Publishing: Cambridge, UK, 2011.

[50] J. N. Burrows, S. Duparc, W. E. Gutteridge, R. H. van Huijsduijnen, W. Kaszubska, F. Macintyre, S. Mazzuri, J. J. Mohrle & T. N. Wells, “New developments in antimalarial target candidate and product profiles”, *Malaria journal*, vol. 16, no. 1, pp. 1-29, 2017.

[51] V. P. S̄ulsen, V. Puente, D. Papademetrio, A. Batlle, V. S. Martino, F. M. Frank & M. E. Lombardo, “Mode of action of the sesquiterpene lactones psilostachyin and psilostachyin c on trypanosoma cruzi”, *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0150526, 2016.

[52] M. Wiederstein & M. J. Sippl, “Topmatch-web: pairwise matching of large assemblies of protein and nucleic acid chains in 3d”, *Nucleic Acids Research*, vol. 48, no. W1, pp. W31-W35, 2020.

[53] C. N. Cavasotto, “In silico drug discovery and design: theory, methods, challenges & applications”. *CRC Press*, 2015.

- [54] N. M. O'Boyle, M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch & G. R. Hutchison, "Open babel: An open chemical toolbox", *Journal of cheminformatics*, vol. 3, no. 1, pp. 1-14, 2011.
- [55] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov & P. E. Bourne, "The protein data bank", *Nucleic acids research*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000.
- [56] U. Consortium, "Uniprot: a worldwide hub of protein knowledge", *Nucleic acids research*, vol. 47, no. D1, pp. D506-D515, 2019.
- [57] A. J. M. Ribeiro, G. L. Holliday, N. Furnham, J. D. Tyzack, K. Ferris & J. M. Thornton, "Mechanism and catalytic site atlas (m-csa): a database of enzyme reaction mechanisms and active sites", *Nucleic acids research*, vol. 46, no. D1, pp. D618-D623, 2018.
- [58] L. Schrodinger, "The pymol molecular graphics system version 1.2 r3pre", 2008.
- [59] J. D. Durrant & J. A. McCammon, "Molecular dynamics simulations and drug discovery", *BMC biology*, vol. 9, no. 1, pp. 1-9, 2011.
- [60] D. A. Case, K. Belfon, I. Ben-Shalom, S. R. Brozell, D. Cerutti, T. Cheatham, *et al.*, "AMBER20", 2020.
- [61] L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gurov, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan & K. Schulten, "Namd2: greater scalability for parallel molecular dynamics", *Journal of Computational Physics*, vol. 151, no. 1, pp. 283-312, 34, 1999.
- [62] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M. R. Shirts, J. C. Smith, P. M. Kasson, D. van der Spoel, *et al.*, "Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit", *Bioinformatics*, vol. 29, no. 7, pp. 845-854, 2013.
- [63] R. Salomon-Ferrer, A. W. Gotz, D. Poole, S. Le Grand & R. C. Walker, "Routine microsecond molecular dynamics simulations with amber on gpus. 2. explicit solvent particle mesh ewald", *Journal of chemical theory and computation*, vol. 9, no. 9, pp. 3878-3888, 2013.
- [64] C. Wang, D. Greene, L. Xiao, R. Qi & R. Luo, "Recent developments and applications of the mmpbsa method", *Frontiers in molecular biosciences*, vol. 4, p. 87, 2018.

[65] B. Kuhn, P. Gerber, T. Schulz-Gasch & M. Stahl, “Validation and use of the mmpbsa approach for drug discovery”, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 48, no. 12, pp. 4040-4048, 2005.

[66] B. R. Miller III, T. D. McGee Jr, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke & A. E. Roitberg, “Mmpbsa. py: an efficient program for end-state free energy calculations”, *Journal of chemical theory and computation*, vol. 8, no. 9, pp. 3314-3321, 2012.

CAPÍTULO IX

Conclusiones y perspectivas

En la actualidad, se dispone de un número reducido de fármacos efectivos frente a las enfermedades de Chagas, Malaria y Leishmaniasis. Los medicamentos disponibles tienen varias desventajas, entre ellas, las altas dosis que se asocian con moderada o alta toxicidad, esquemas terapéuticos prolongados que disminuyen la adherencia, y esto a su vez favorece la circulación de parásitos cada vez menos sensibles a los medicamentos. Adicionalmente, los costos de la terapia se vuelven excesivos para los países endémicos. La ausencia de medicamentos efectivos evidencia la necesidad de buscar nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de estas enfermedades.

Asimismo, las enfermedades de Chagas, Malaria y Leishmaniasis se consideran enfermedades “huérfanas” o “desatendidas” debido al poco interés de la industria farmacéutica para desarrollar una alternativa terapéutica, por ello la OMS a través de estrategias como el programa especial para la investigación en enfermedades tropicales (TDR, del inglés, *Tropical Disease Research*) y enfermedades huérfanas o desatendidas (NTD, del inglés, *Neglected Tropical Disease*), han determinado como prioridad el desarrollo y descubrimiento de nuevos tratamientos que sean accesibles a las comunidades afectadas, seguros y que permitan obtener una mejor adherencia al tratamiento al ser de fácil administración y de corta duración, además de un costo que pueda ser asumido por los países endémicos.

En la búsqueda de alternativas terapéuticas, en este trabajo de Tesis Doctoral concluimos que:

- Diseñamos tres nuevas series de compuestos derivados del Mentol, Timol y Eugenol que cumplen los criterios de racionalidad del tipo “*drug-likeness*”, las reglas de Lipinski y se concentran en una zona del espacio fisicoquímico cercana al menos a un fármaco que actualmente se utiliza para la enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Malaria.
- Sintetizamos y caracterizamos por distintas técnicas espectroscópicas como: RMN-¹H, RMN-¹³C (también técnicas bidimensionales: COSY, HSQC y HMBC),

FTIR y HRMS veintisiete nuevas prodrogas de Mentol (**1a-i**), Timol (**2a-i**) y Eugenol (**3a-i**) con el objetivo de mejorar la actividad biológica de los compuestos de partida.

- Los resultados de estabilidad química indicaron que todos los nuevos derivados son sensibles a la hidrólisis química, concluyendo así que estos compuestos tienen comportamiento de prodrogas. A su vez, se identificó que a pH 5,8 resultó ser la condición más estable para todos los derivados.
- Las nuevas prodrogas diseñadas lograron permear a través de una membrana artificial biomimética. Estos resultados nos permiten deducir la factibilidad del pasaje de estos nuevos compuestos a través de membranas biológicas.
- A través del índice de selectividad -que correlaciona los valores obtenidos de citotoxicidad y actividad biológica- definimos avanzar a los experimentos *in vivo* con los siguientes candidatos: **1f**, **2a**, **2d**, **2f** y **3c** para la evaluación de la actividad tripanocida; **1b**, **1d**, **1e** y **3c** para la actividad leishmanicida; y **2d**, **2e**, **2h** y **3c** para la actividad antiplasmodial.
- Concluimos que el Mentol, Timol y Eugenol, que poseen estructuras similares al sustrato natural de la enzima DHODH involucrada en las vías biosintéticas de dichos parásitos, pueden interactuar en el sitio de unión del sustrato y lograr generar un cambio en su actividad enzimática.

Es importante destacar que para la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon diferentes técnicas y metodologías que hicieron a la formación integral en el ámbito profesional y académico.

En cuanto a las proyecciones, es importante mencionar que varios de los derivados del Mentol, Timol y Eugenol, debido a los cambios realizados en sus propiedades fisicoquímicas, son potenciales candidatos antiprotozoarios que avanzará a estudios biológicos *in vivo*. Esta actividad, se está iniciando y se realizará en colaboración con el PECET de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia, bajo la supervisión de la Dra. Sara Robledo Restrepo.

Por otro lado, debido a las predicciones obtenidas a partir de los estudios *in silico* realizados con las proteínas TcDHODH, LbDHODH y PfDHODH, se planteó la necesidad de realizar estudios enzimáticos del tipo proteína-ligando con la finalidad de poder evaluar las actividades enzimáticas y las cinéticas de unión de estas proteínas con el Mentol, Timol y

Eugenol. Esta actividad se realizará junto al Dr. Walter Rivarola en el Centro de estudios e investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis en la Universidad Nacional de Córdoba.

Por último, es de interés realizar estudios de preformulación de las moléculas seleccionadas como candidatas con la finalidad de investigar parámetros de formulación, ensayos de compatibilidad, características de la forma de dosificación, datos biofarmacéuticos, entre otros. Dichas actividades serán llevadas a cabo bajo la supervisión del Dr. Daniel Allemandi en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA). Actualmente, se encuentra en desarrollo una tesis doctoral que abarca la determinación de dichas propiedades.

CAPÍTULO X

Producción científica

Los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral fueron publicados en siguientes artículos científicos:

- **C. M. Clemente**, S. M. Robledo & S. Ravetti, “Menthol carbonates as potent antiparasitic agents: synthesis and in vitro studies along with computer-aided approaches”, Preprint. Aceptado en *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022.
- **C. M. Clemente**, T. Pineda, L. M. Yepes, Y. Upegui, D. A. Allemandi, S. M. Robledo & S. Ravetti. (2021). Eugenol carbonate activity against *Plasmodium falciparum*, *Leishmania braziliensis*, and *Trypanosoma cruzi*. *Archiv der Pharmazie*, e2100432. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100432>
- **C. M. Clemente**, S. Ravetti, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, T. Pineda & S. M. Robledo (2021). Synthesis, In Vitro Antiprotozoal Activity and Cytotoxicity of New Thymol Carbonate Derivatives. *ChemistrySelect*, 6(25), 6597-6600. <https://doi.org/10.1002/slct.202101461>
- J. Fabbri, **C. M. Clemente**, N. Elissondo, G. Gambino, S. Ravetti, L. Y. Hergert, S.D. Palma & M. C. Elissondo (2020). Anti-echinococcal activity of menthol and a novel prodrug, menthol-pentanol, against *Echinococcus multilocularis*. *Acta Tropica*, 105411. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105411>

Las colaboraciones realizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral llevó a cabo la publicación de los siguientes artículos científicos:

- R. Ochoa, K. Palacio-Rodriguez, **C. M. Clemente** & N. S. Adler (2021). dockECR: open consensus docking and ranking protocol for virtual screening of small molecules. JMG 108023, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2021.108023>
- **C. M. Clemente**, M. I. Freiburger, S. Ravetti, D. Beltramo, A.G. Garro (2021). An *in silico* analysis of Ibuprofen enantiomers in high concentrations of sodium chloride

with SARS-CoV-2 main protease. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. J Biomol Struct Dyn, 2021, 1-12. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1872420>.

- S. Ravetti, **C. M. Clemente**, S. G. Brignone, Hergert Y., Allemand D.A. & Palma (2019). Ascorbic Acid in Skin Health. S.Cosmetics, 6(4), 58.(2019). <https://doi.org/10.3390/cosmetics6040058>

Capítulo en libro:

- S. G. Brignone, **C. M. Clemente**, L. Y. Hergert, A. G. Garro, S. D. Palma, S. Ravetti
Capítulo 6: Current Understanding Of The Vitamin C Effects In Skin. Libro: Biofunctional Textiles for an Aging Skin. Vol 1. ISBN: 978-620-3-58933-7. Publicado: 01/2022.

A su vez, se realizó la colaboración con la formación de recursos humanos mediante la co-dirección de la beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (Becas EVC-CIN) de la estudiante de la carrera de Medicina Valeria Fernández Barrenechea.

Presentaciones en eventos científicos internacionales:

- **C. M. Clemente**, S. M. Robledo, T. Pineda, L. M. Yepes, Y. Upegui, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, S. Ravetti. Menthol, Eugenol and Thymol carbonate derivatives as potent antiparasitic agents: synthesis and in vitro studies along with computer-aided approaches. WorldLeish7, 2022.
- S. E. Rastelli, S. G. Gómez de Saravia, M. R. Viera, S. Ravetti, A. Inda, **C. M. Clemente**. Menthol and its derivatives with potential action bactericide and alguicide. Congreso Lationamericano de plantas medicinales (COLAPLAMED), Virtual, Septiembre, 2021.
- **C. M. Clemente**, L. Y. Hergert, D. A. Allemandi, A.G. Garro, S. M. Robledo, S. Ravetti. Prodrugs of eugenol as antiplasmodial agents and its possible mechanism of action. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) 2021.
- **C. M. Clemente**, C. E. Leonetti, S. Ravetti, D. U. Ferreira, R. G. Parra, M. I. Freiburger. Energetic Local Frustration Improves Protein-Ligand Docking Predictions. International Society for Computational Biology - LA SOIBIO BIONETMX 2020. Octubre, 2020.

- **C. M. Clemente**, C. E. Leonetti, S. Ravetti, R. G. Parra, D. U. Ferreiro, M. I. Freiburger. Local Frustration Improves Protein-Ligand Docking Predictions. Latin American Student Council Symposium 2020. Octubre, 2020.
- **C. M. Clemente**, C. E. Leonetti, S. Ravetti, R. G. Parra, M. I. Freiburger. Novel protocol for reverse docking in Neglected Tropical Diseases incorporates local frustration as a predictor of biological relevance. Women in Bioinformatics & Data Science LA conference. Septiembre, 2020.
- J. Dimmer, M. Juarez, **C. M. Clemente**, A. Inda, S. Ravetti, W. Rivarola. XXV Leishmanicidal activity of a new Carvacrol derivative. Congreso de la Federación Latinoamericana de Parasitología. V Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. Ciudad de Panamá, Panamá. Noviembre, 2019.
- **C. M. Clemente**, S. Ravetti, L. Y. Hergert, D. A. Allemandi, S. M. Robledo. Latin American Synthesis, characterization and biological evaluation of a novel thymol-derived against trypanosomiasis, leishmaniasis, and malaria. Workshop in Structural Bioinformatics of Proteins. Medellín, Colombia. Septiembre. 2019.
- J. Fabbri, **C. M. Clemente**, S. Ravetti, L. Y. Hergert, M. C. Elissondo. Clinical efficacy of menthol and menthol-pentanol on Echinococcus multilocularis metacestodes. Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018. 4th Meeting of ResNet NPND. Buenos Aires, Argentina. Diciembre, 2018.
- S. Ravetti, L. Y. Hergert, **C. M. Clemente**, M. Juarez, M. Strauss, W. Rivarola. Design, synthesis and evaluation of the *in vitro* biological activity of Trypanosoma cruzi against a thymol derivative. 1° Congreso Internacional Avances en Salud Humana, Villa María, Córdoba, Argentina. Octubre, 2018.
- L. Y. Hergert, S. Ravetti, **C. M. Clemente**, S. G. Brignone, S. Martinez. Antimicrobial activity of two standardized extracts proposed as potential preservative agents for contact lenses. 1° Congreso Internacional Avances en Salud Humana, Villa María, Córdoba, Argentina. Octubre, 2018.
- J. Fabbri, C. M. Albani, P. E. Pensel, **C. M. Clemente**, S. Ravetti, L. Y. Hergert, M. C. Elissondo. In vitro effect of menthol and menthol-pentanol on echinococcus multilocularis protococcus. XL Jornadas Internacionales de Hidatidología. XXXII

Jornadas Nacionales de Hidatidosis. Tandil, Buenos Aires, Argentina. Octubre, 2017.

Presentaciones en científicos nacionales:

- **C. M. Clemente**, A. Inda, F. Manzanelli, D. A. Allemandi, L. Y. Hergert, S. M. Robledo, S. Ravetti. Thymol prodrugs as antiparasitic agents: design, synthesis, elucidation and in vitro evaluation against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* y *Plasmodium falciparum*. Asociación Argentina de Farmacología Experimental. Octubre, 2021.
- **C. M. Clemente**, A. Inda, S. Ravetti, D. A. Allemandi, S. M. Robledo., L. Y. Hergert. Synthesis, characterization and in vitro evaluation of a new monoterpene derivative against *Trypanosoma cruzi*. SAIC-SAFE-SAB-SAP. Mar del Plata, Noviembre, 2019.
- **C. M. Clemente**, L. Y. Hergert, S. M. Robledo, D. A. Allemandi, S. Ravetti. *In vitro* evaluation of a new menthol derivative against *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. 1º Reunión Conjunta RICiFa-SAFE. San Luis, Argentina. Noviembre, 2018.

Las actividades de investigación descritas fueron financiadas por distintos subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba e Instituto de Investigación de la Universidad Nacional de Villa María.

Por último, se mencionan las becas obtenidas en el marco de esta Tesis Doctoral:

- Beca Doctoral Interna (2017-2022). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
- Sociedad Argentina Farmacología Experimental (2018). Asistencia a 1º Reunión Conjunta RICiFa-SAFE.
- Centro Latinoamericano de Formación Interdisciplinaria (CELFI)-Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (2018). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de Buenos Aires.
- Universidad Nacional de Villa María. Programa de Movilidad e Intercambio para Docentes e Investigadores (2019).
- UNU-BIOLAC, CABANA, EMBL-EBI (2019). Latin American Workshop in

Structural Bioinformatics of Proteins. Universidad EAFIT in Medellin, Colombia.

- Durham University - England and Global Challenge Research Fund (2019).
Workshop in Techniques and Technologies in Drug Discovery.

Anexo I

Resultados de Resonancia Magnética Nuclear

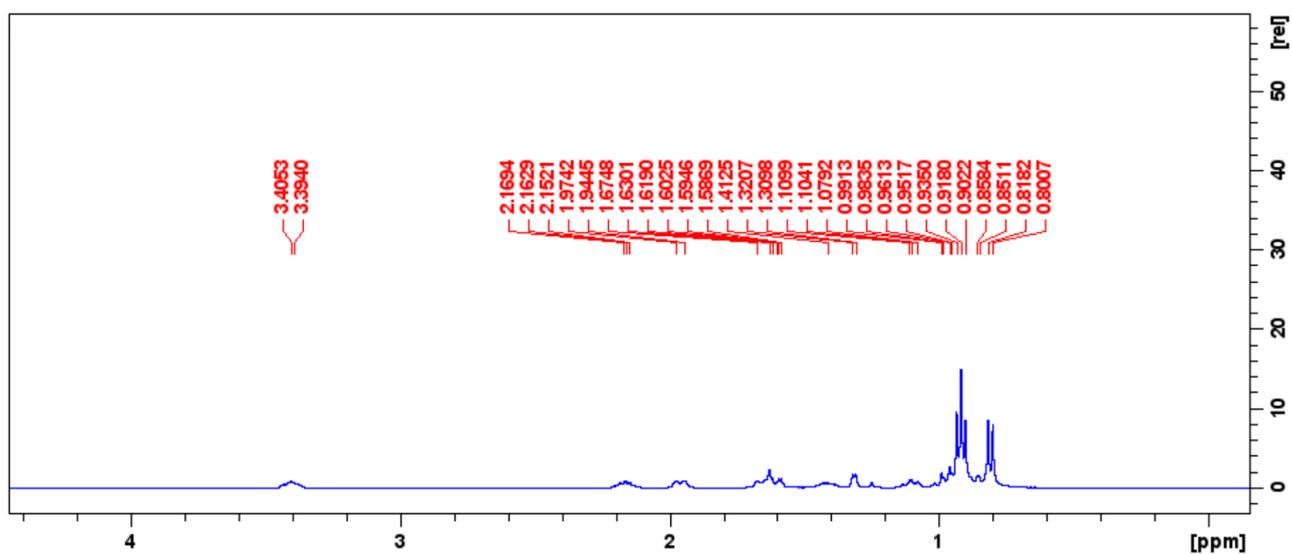


Figura A1.1. RMN-¹H Mentol (1).

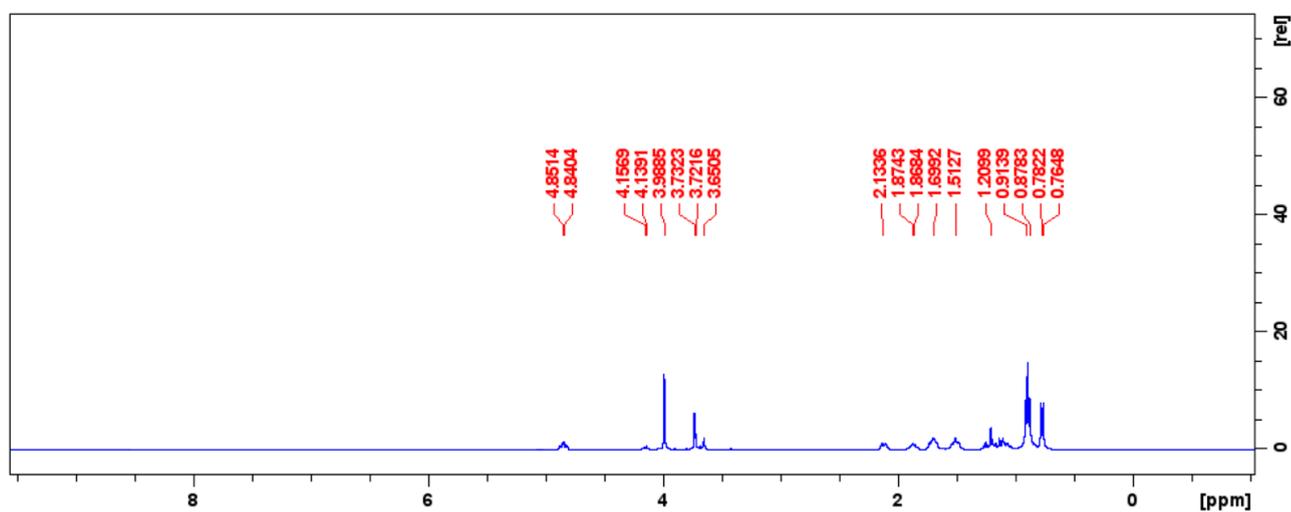


Figura A1.2. RMN-¹H compuesto 1a.

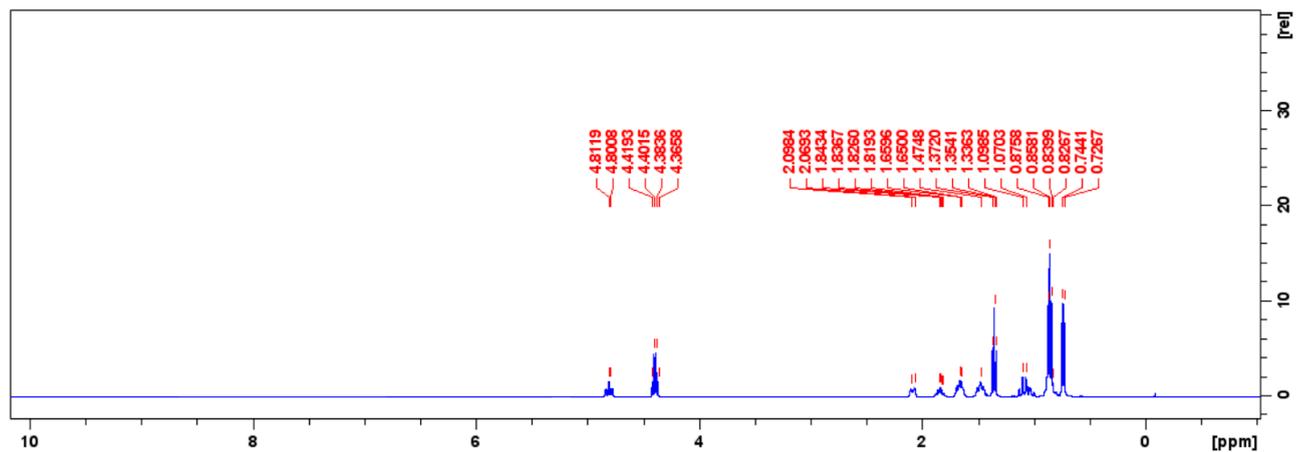


Figura A1.3. RMN-¹H compuesto 1b.

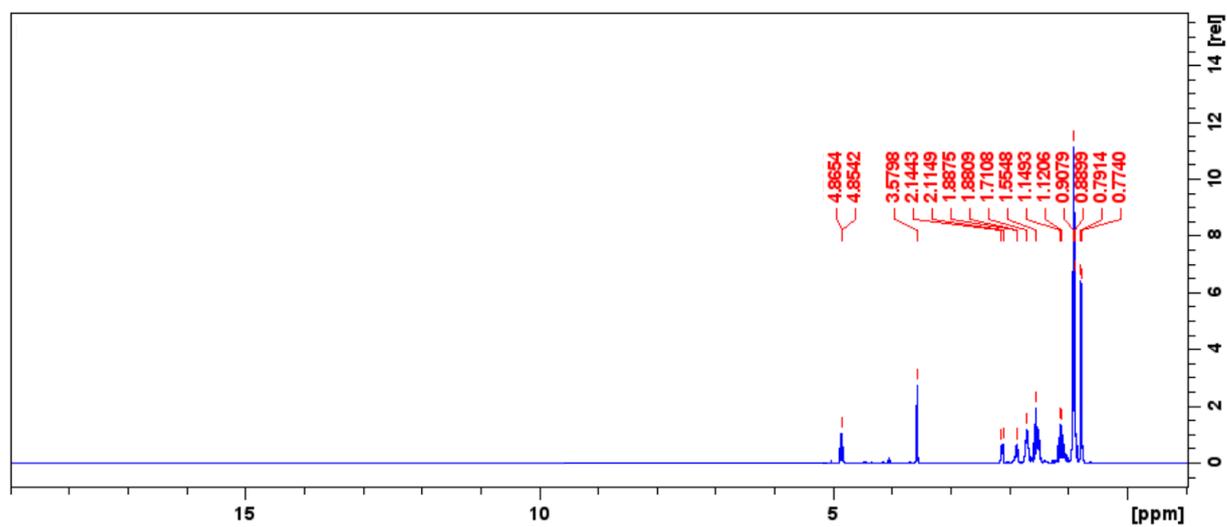


Figura A1.4. RMN-¹H compuesto 1c.

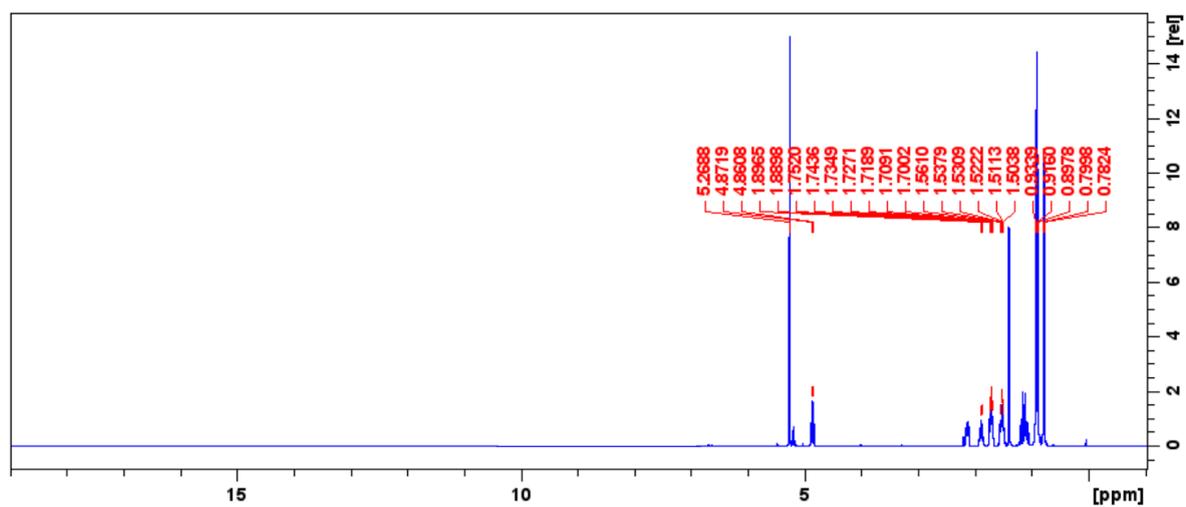


Figura A1.5. RMN-¹H compuesto 1d.

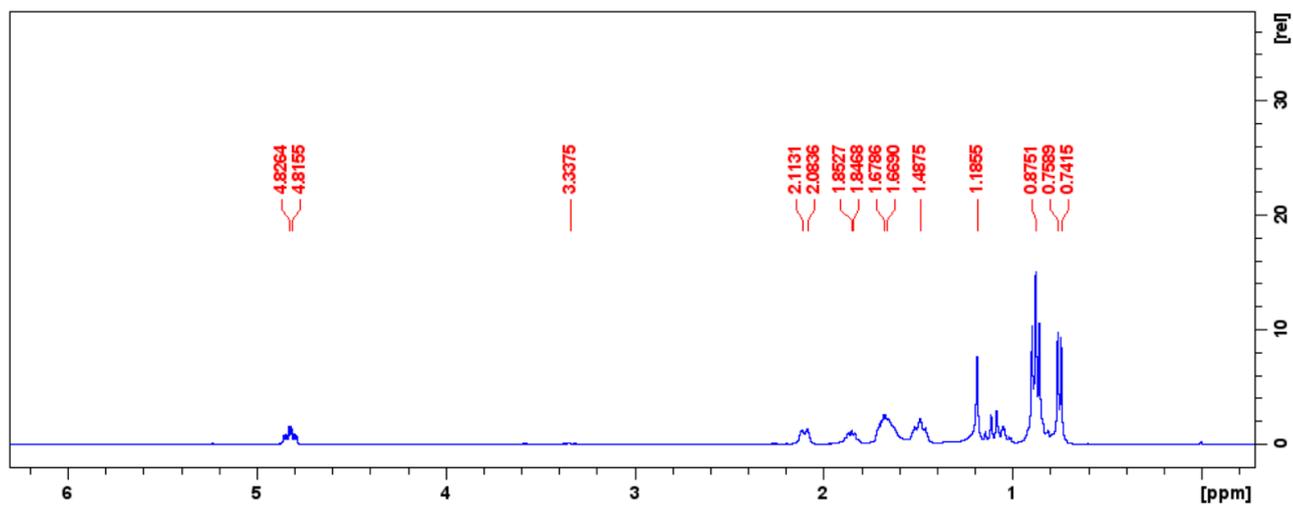


Figura A1.6. RMN-¹H compuesto 1e.

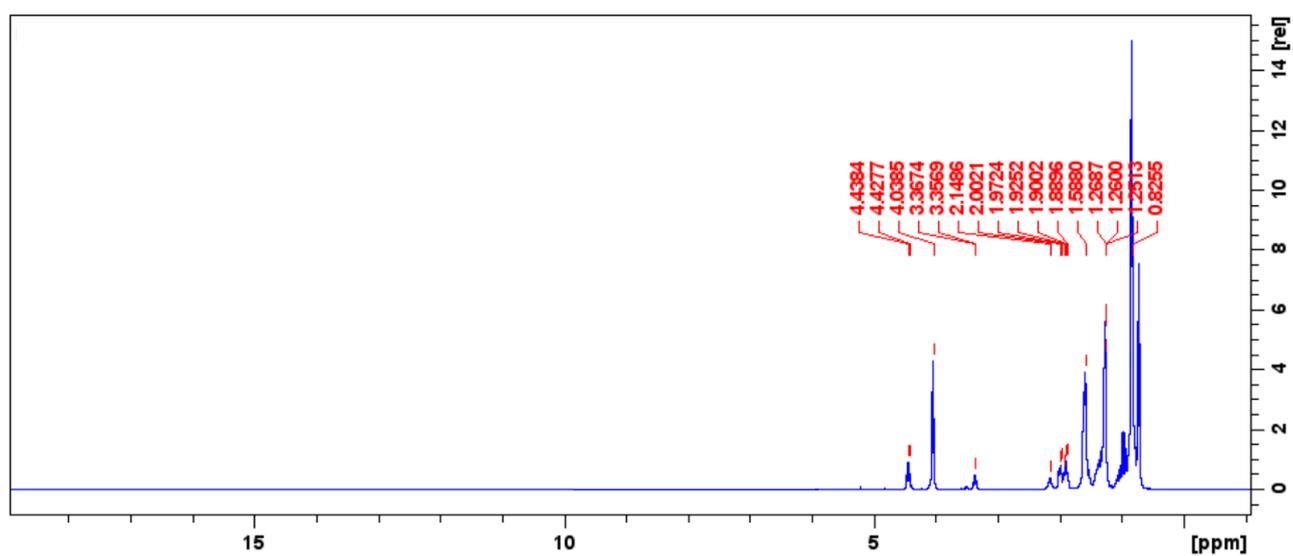


Figura A1.7. RMN-¹H compuesto 1f.

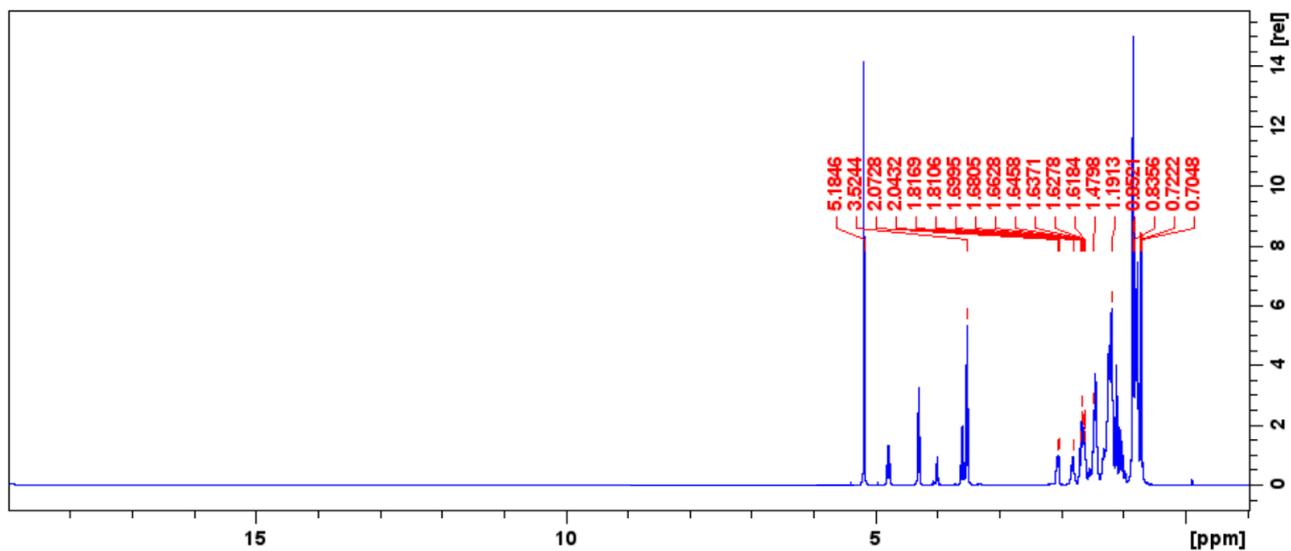


Figura A1.8. RMN-¹H compuesto **1g**.

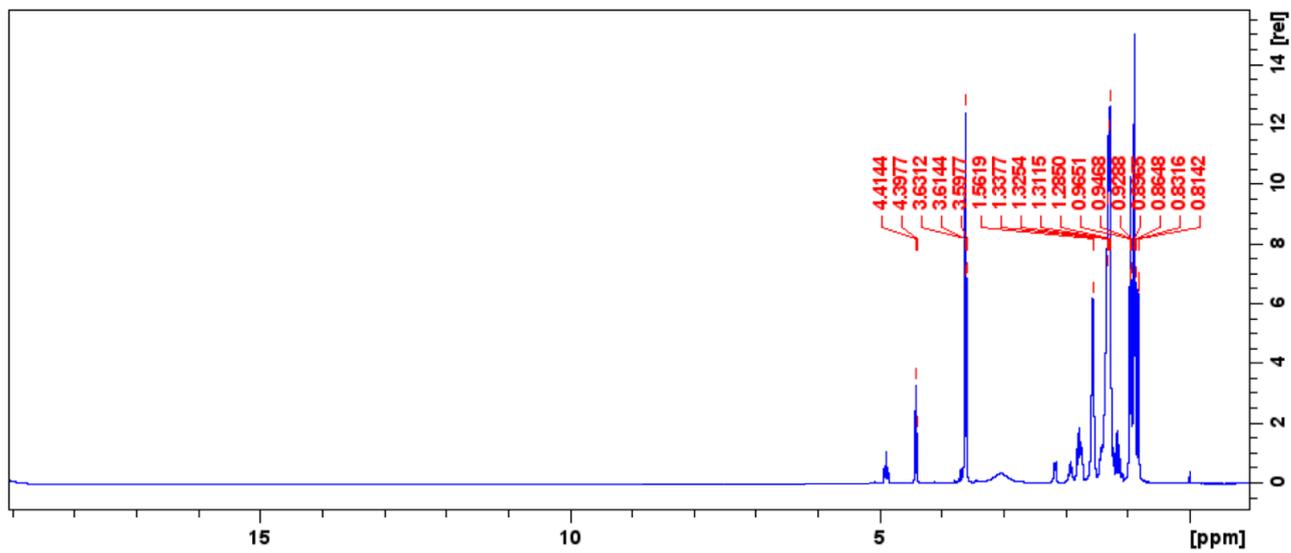


Figura A1.9. RMN-¹H compuesto **1h**.

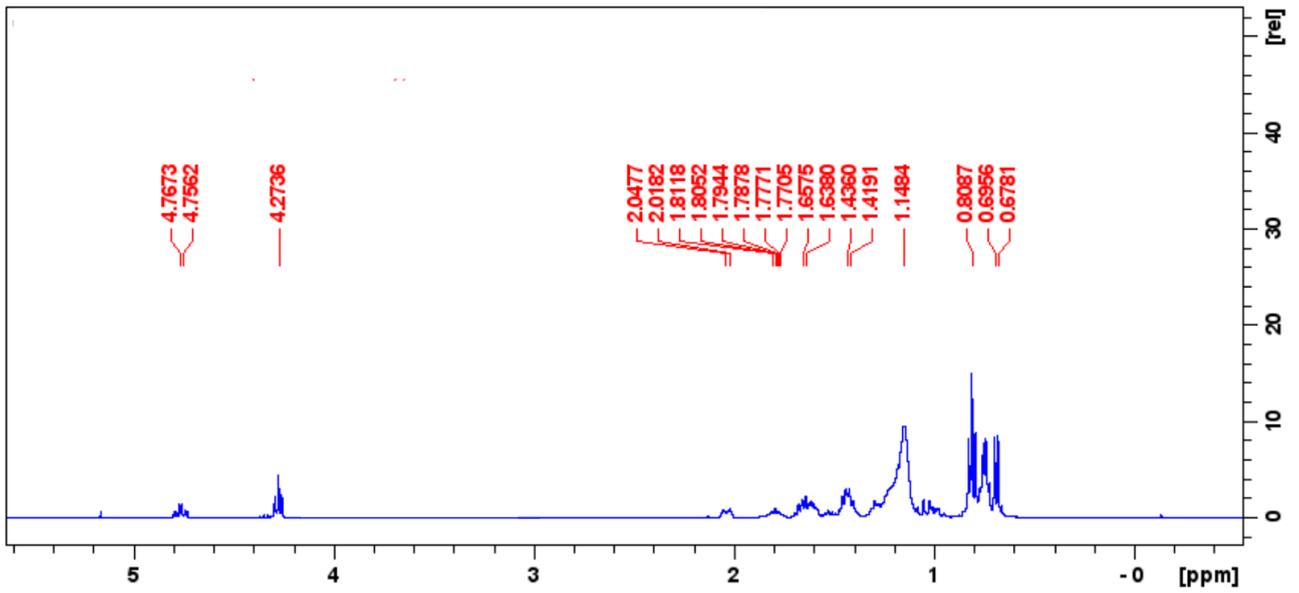


Figura A1.10. RMN-¹H compuesto **1i**.

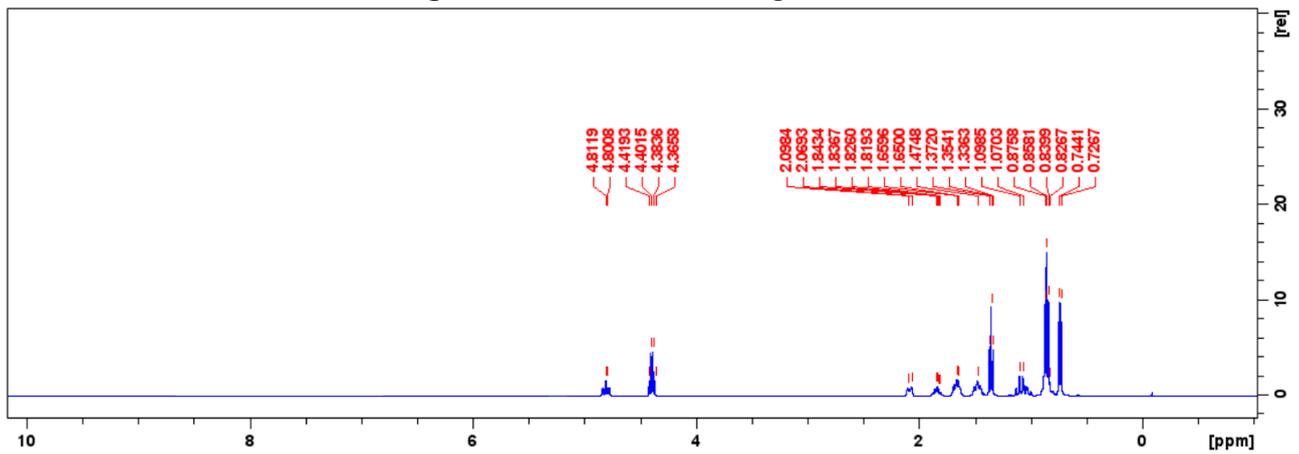


Figura A1.11. RMN-¹H Timol (**2**).

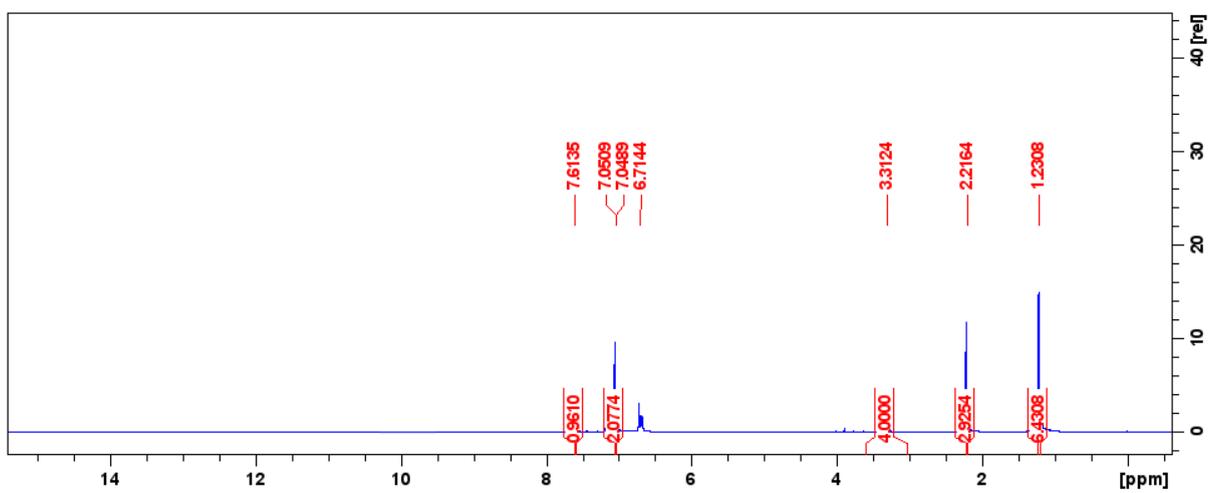


Figura A1.12. RMN-¹H compuesto **2a**.

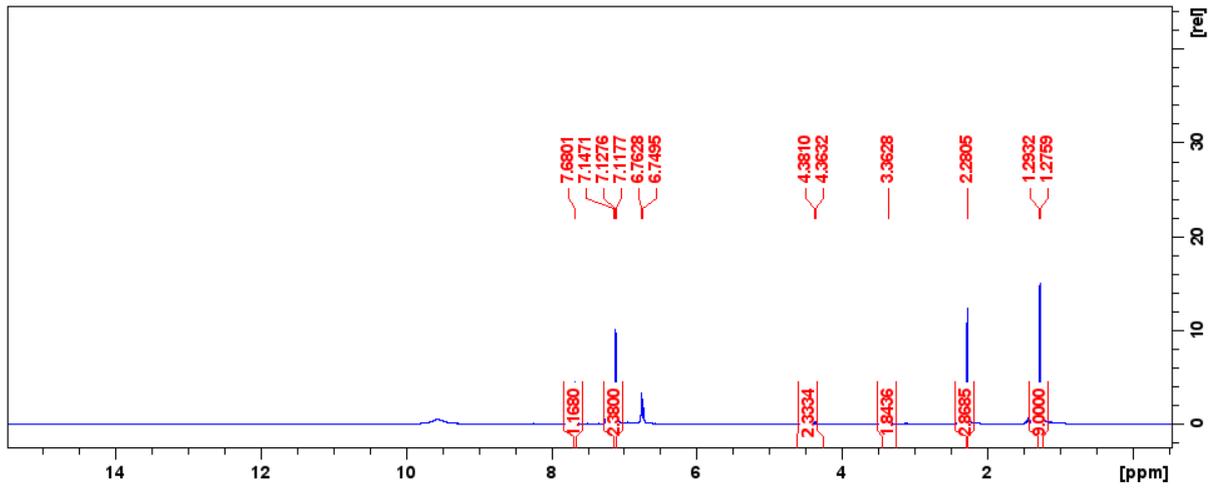


Figura A1.13. RMN-¹H compuesto 2b.

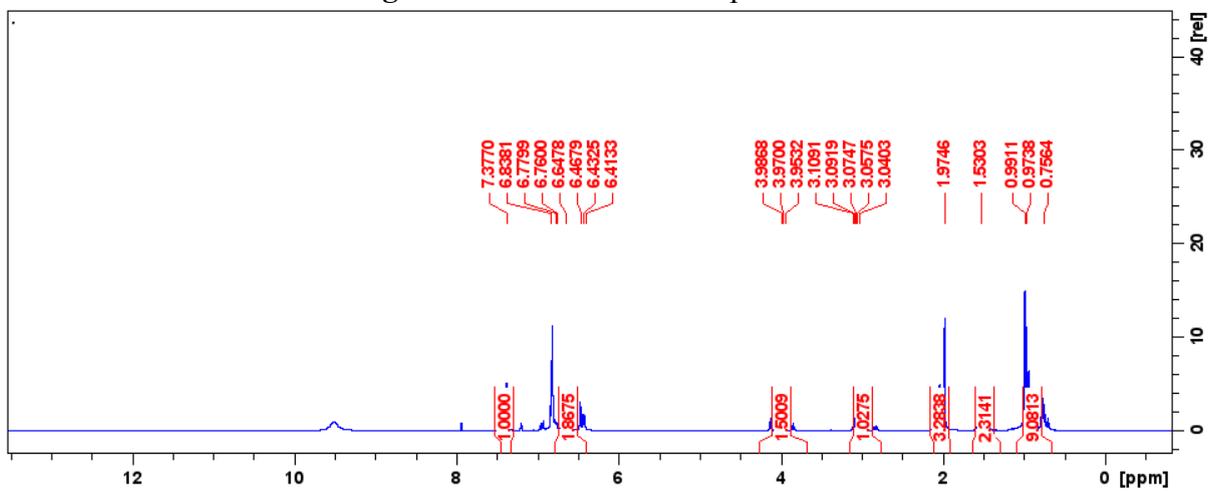


Figura A1.14. RMN-¹H compuesto 2c.

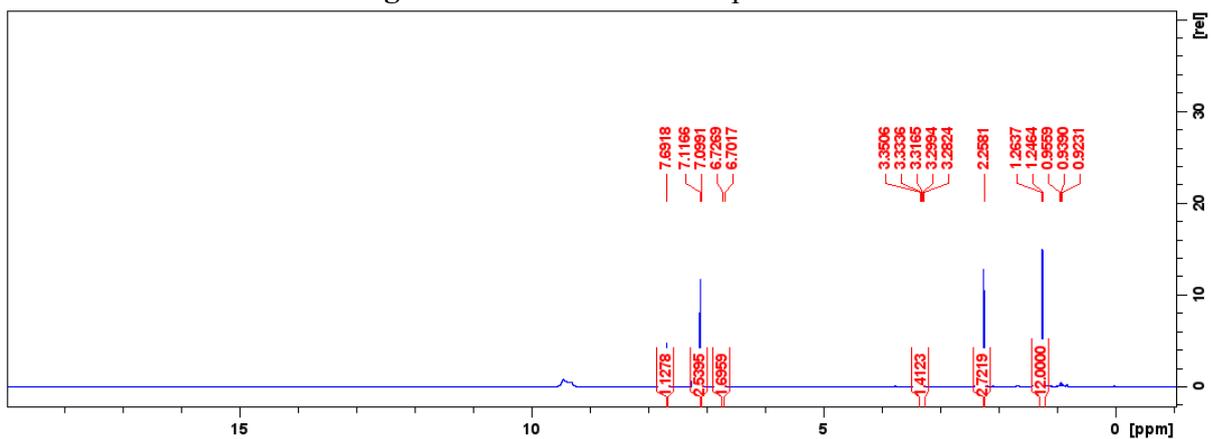


Figura A1.15. RMN-¹H compuesto 2d.

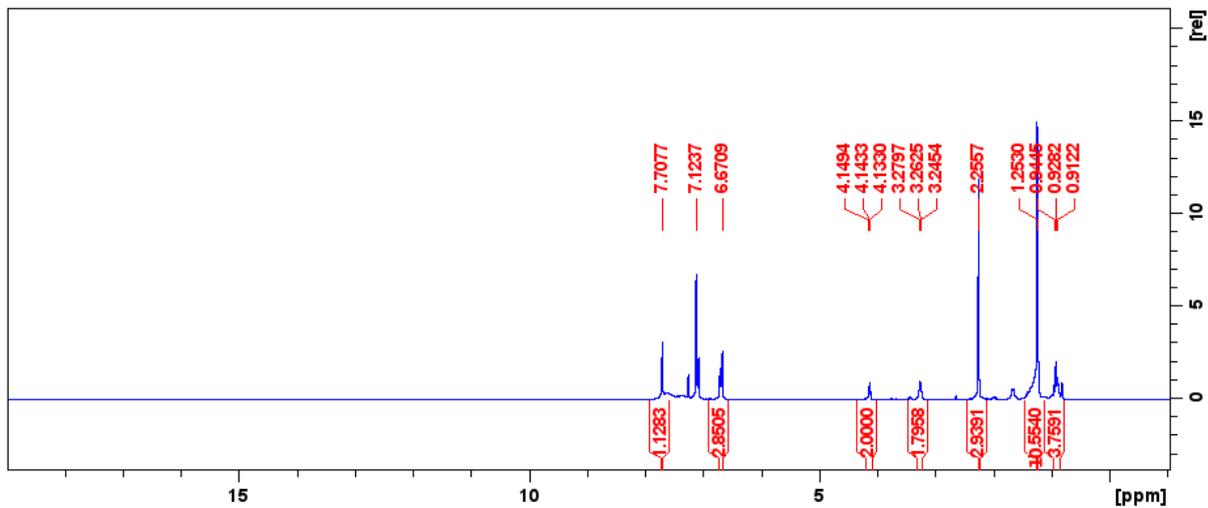


Figura A1.16. RMN-¹H compuesto 2e.

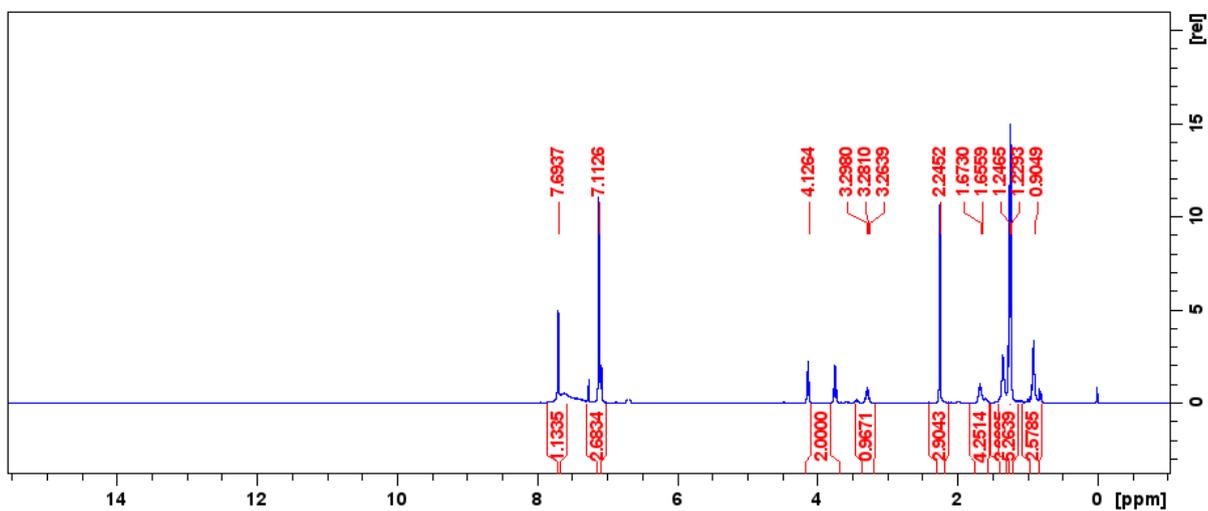


Figura A1.17. RMN-¹H compuesto 2f.

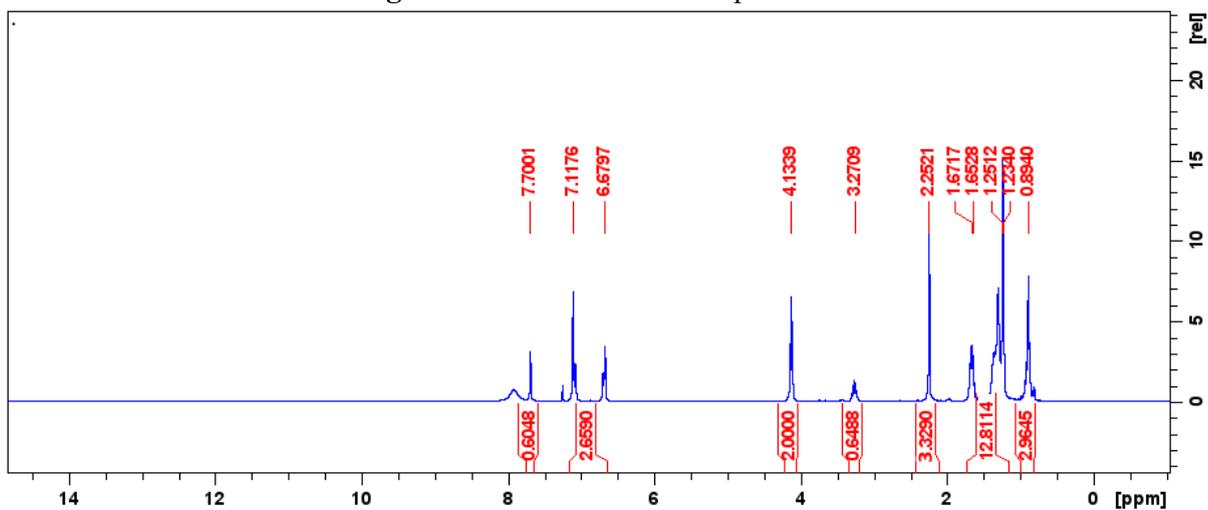


Figura A1.18. RMN-¹H compuesto 2g.

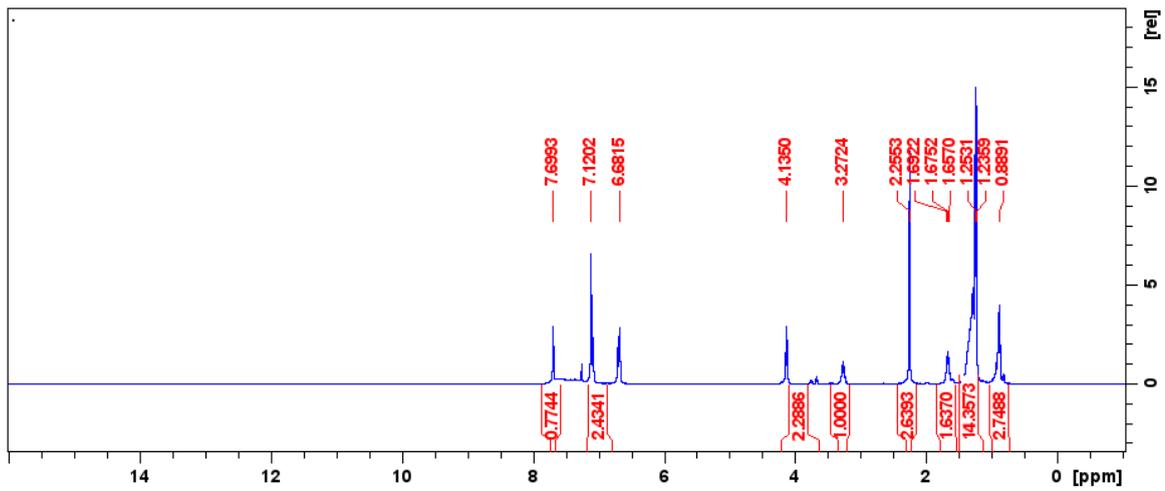


Figura A1.19. RMN-¹H compuesto 2h.

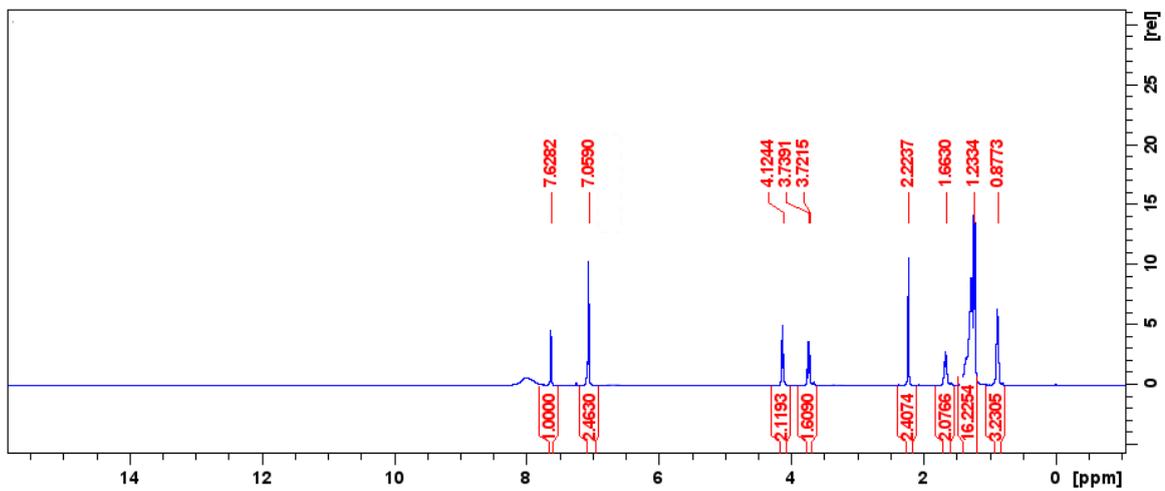


Figura A1.20. RMN-¹H compuesto 2i.

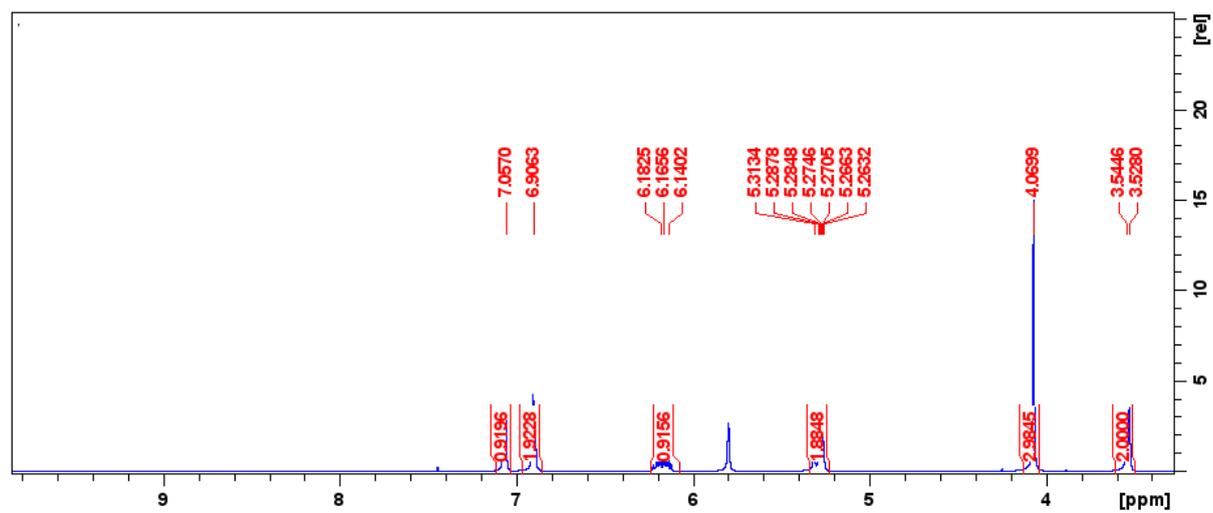


Figura A1.21. RMN-¹H Eugenol (3).

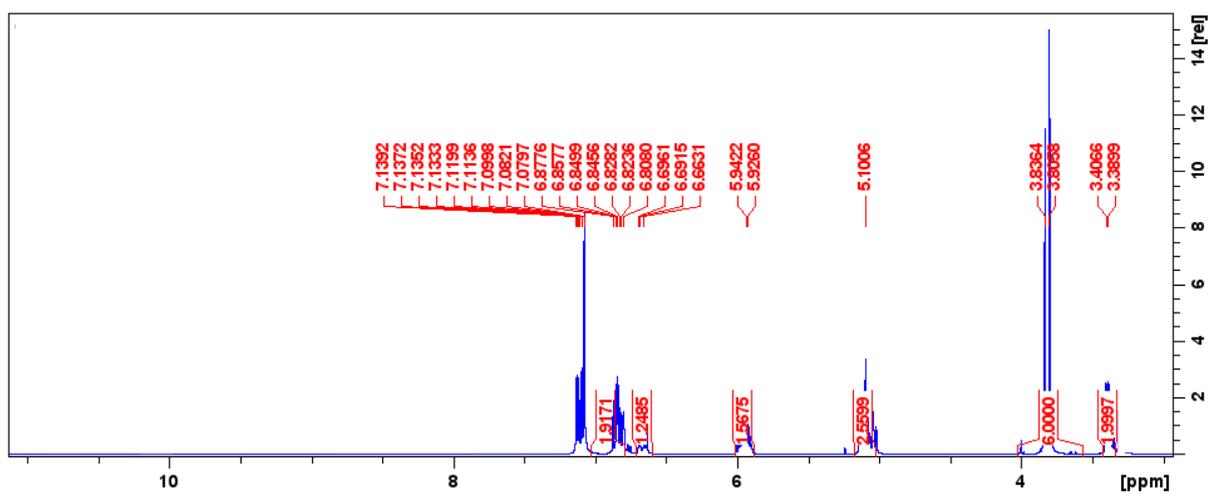


Figura A1.22. RMN-¹H compuesto 3a.

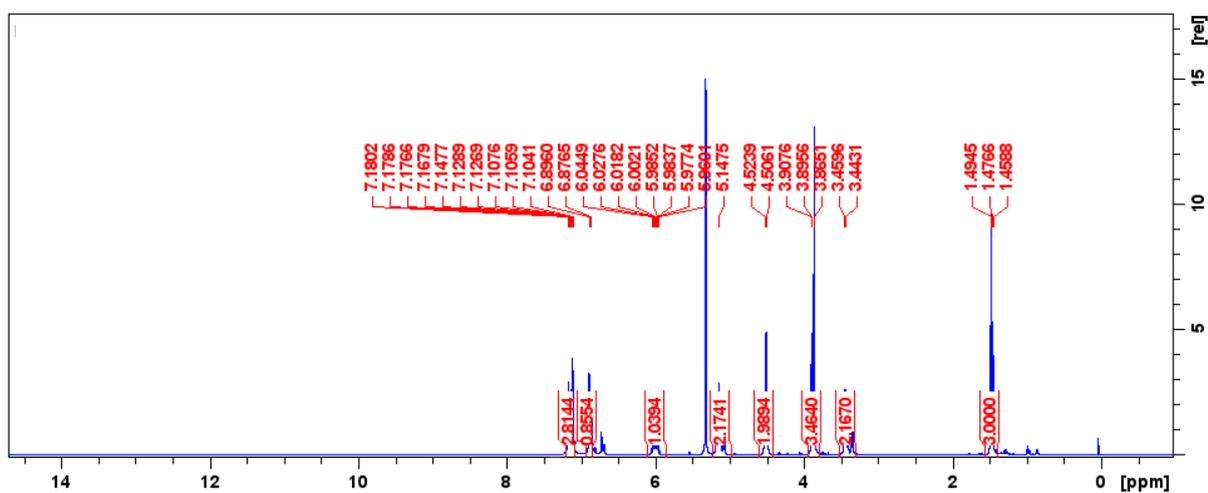


Figura A1.23. RMN-¹H compuesto 3b.

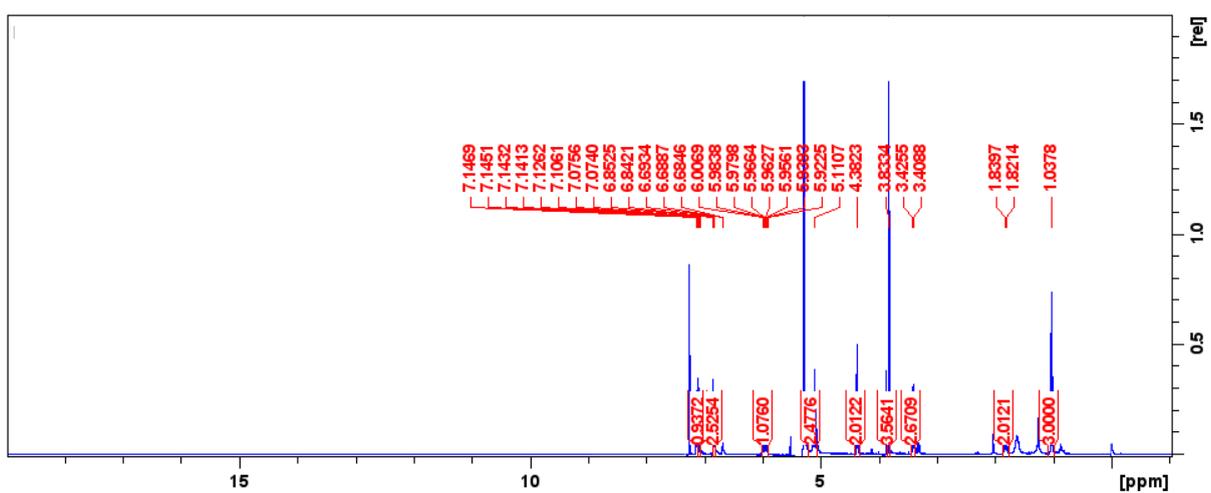


Figura A1.24. RMN-¹H compuesto 3c.

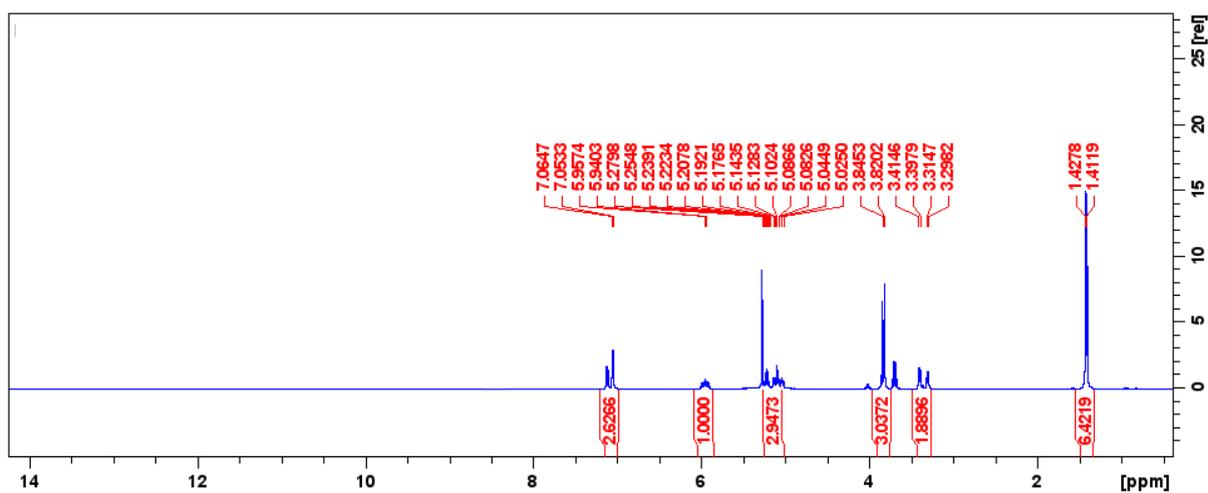


Figura A1.25. RMN-¹H compuesto 3d.

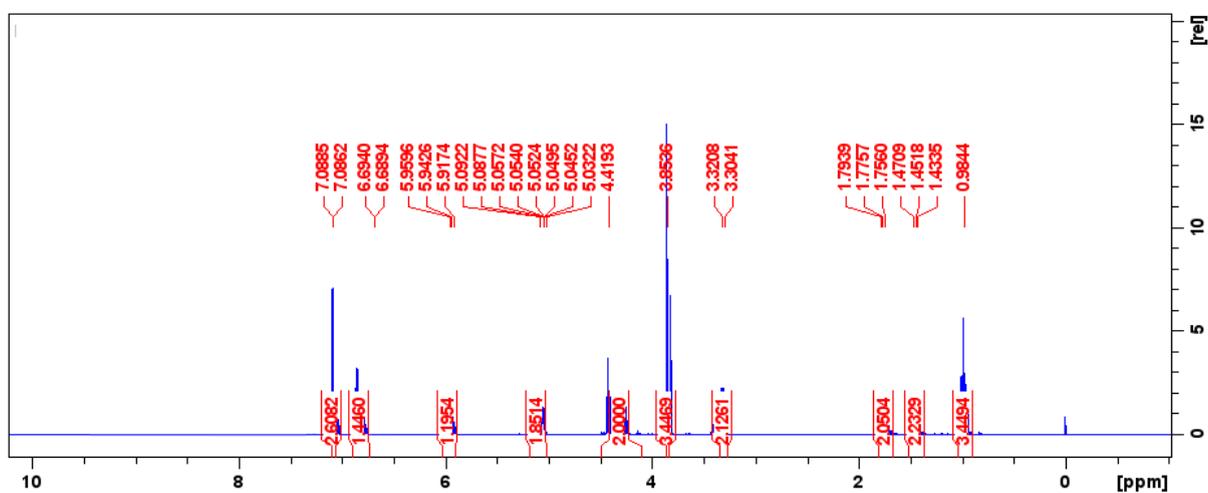


Figura A1.26. RMN-¹H compuesto 3e.

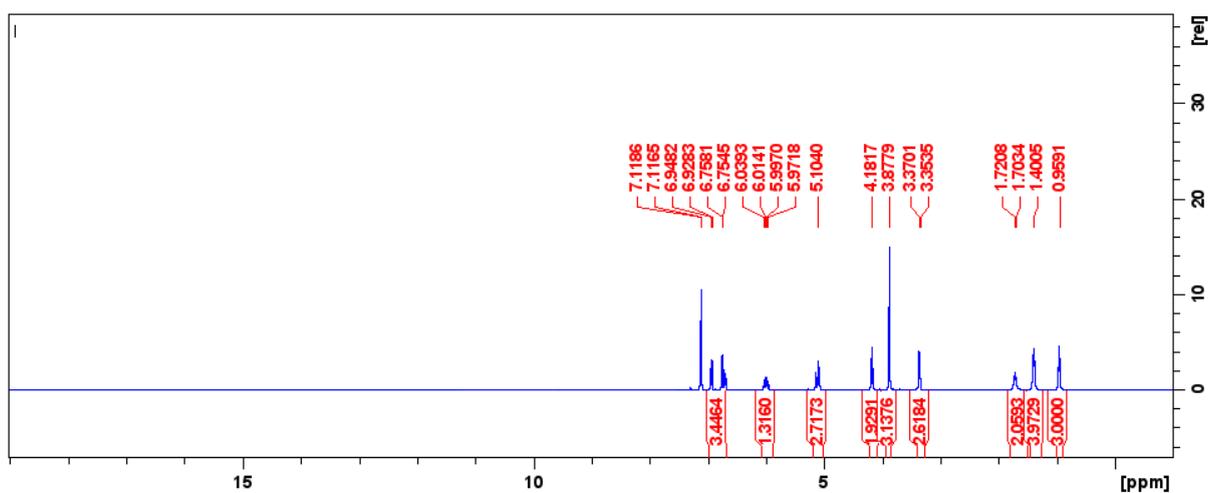


Figura A1.27. RMN-¹H compuesto 3f.

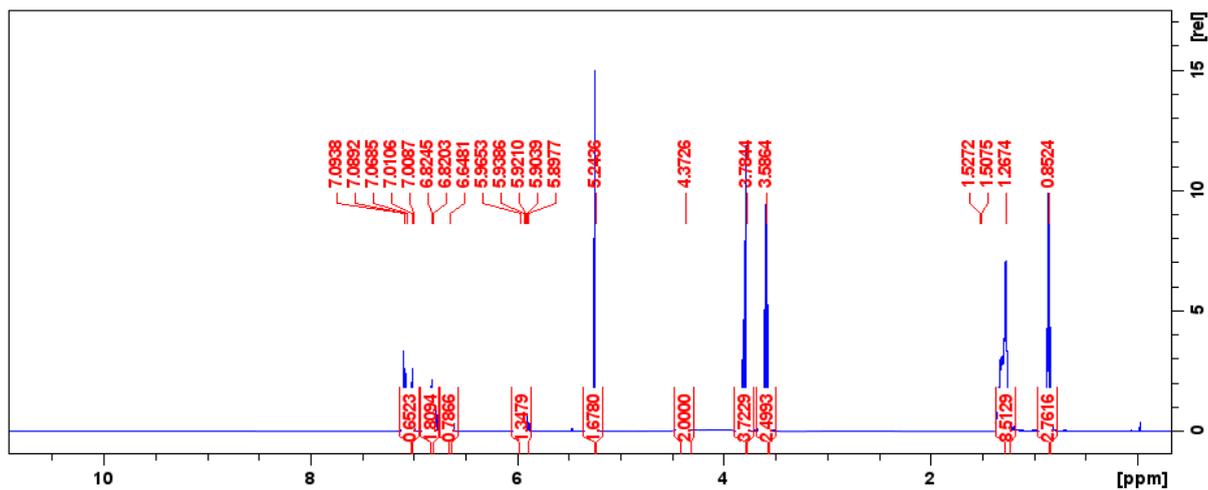


Figura A1.28. RMN-¹H compuesto 3g.

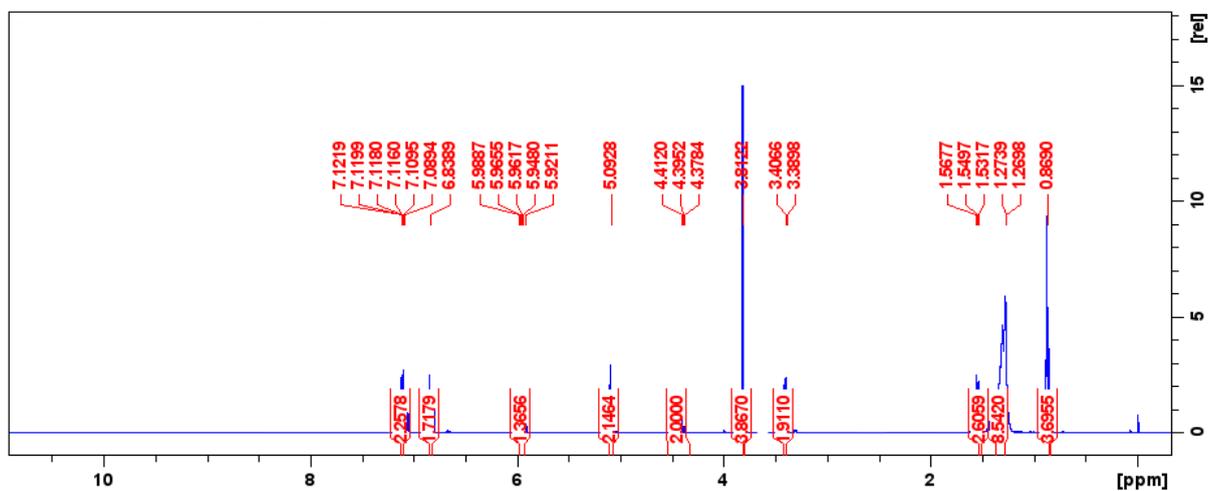


Figura A1.29. RMN-¹H compuesto 3h.

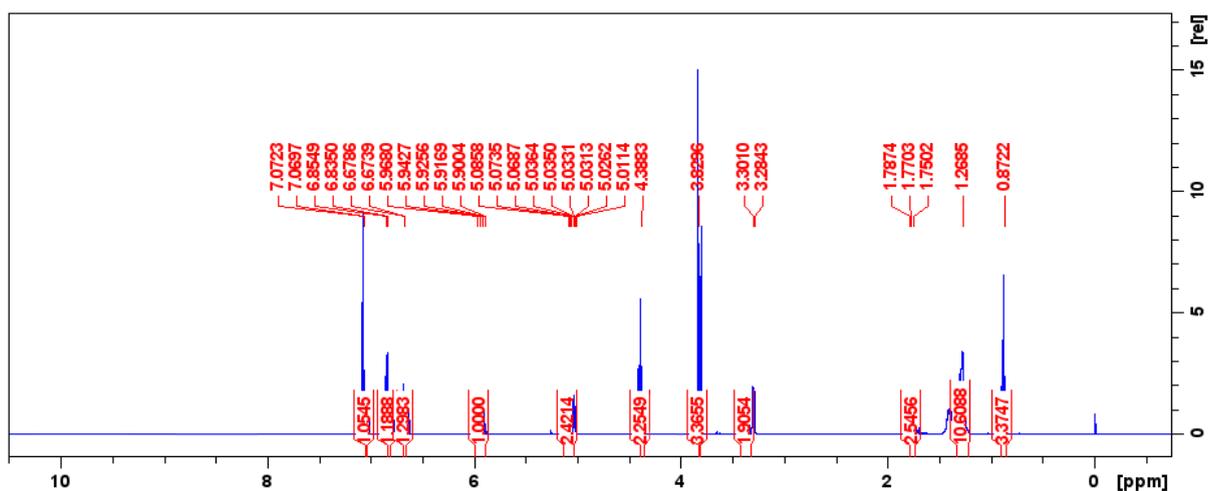


Figura A1.30. RMN-¹H compuesto 3i.

Anexo II

Resultados de Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier

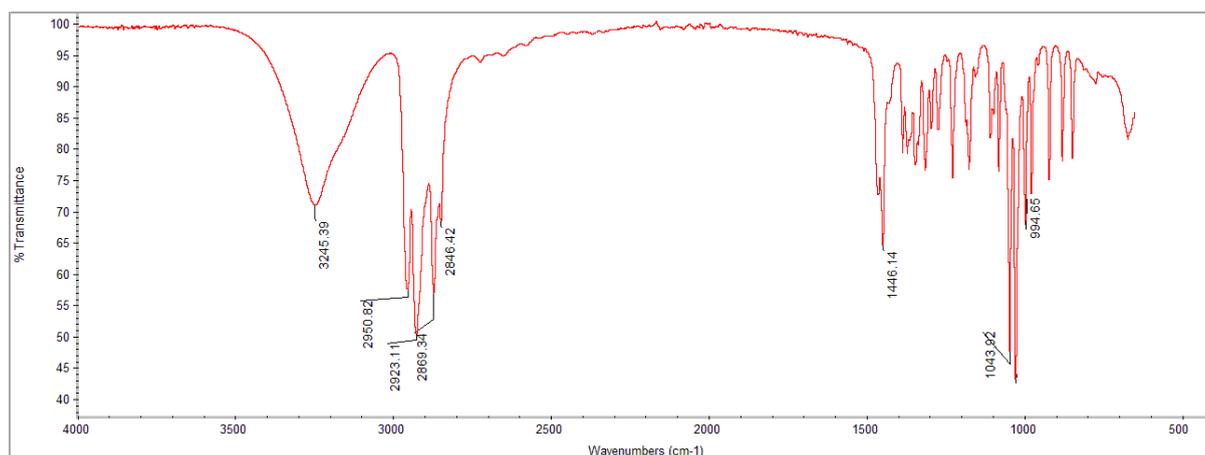


Figura A2.1. FTIR Mentol (1).

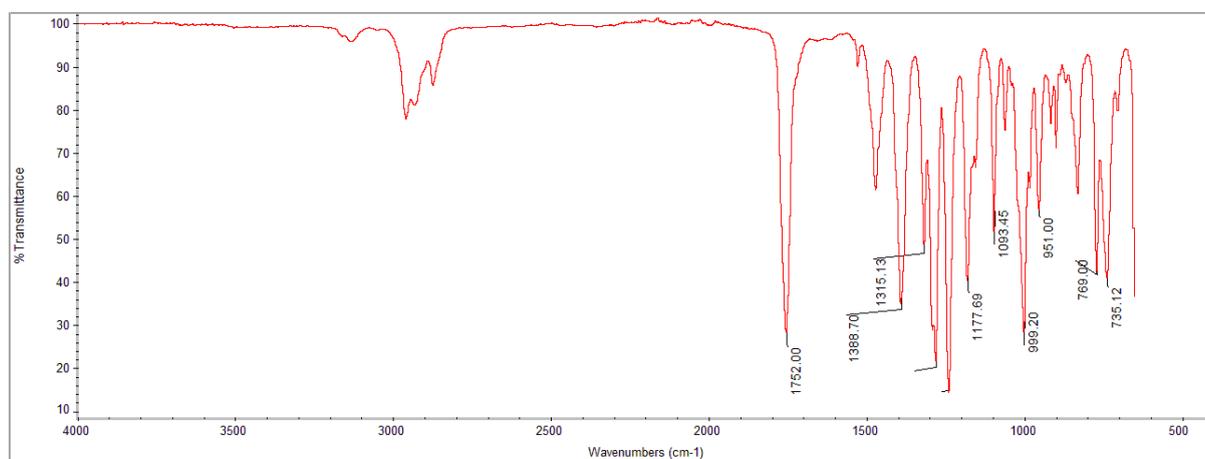


Figura A2.2. FTIR compuesto 1a.

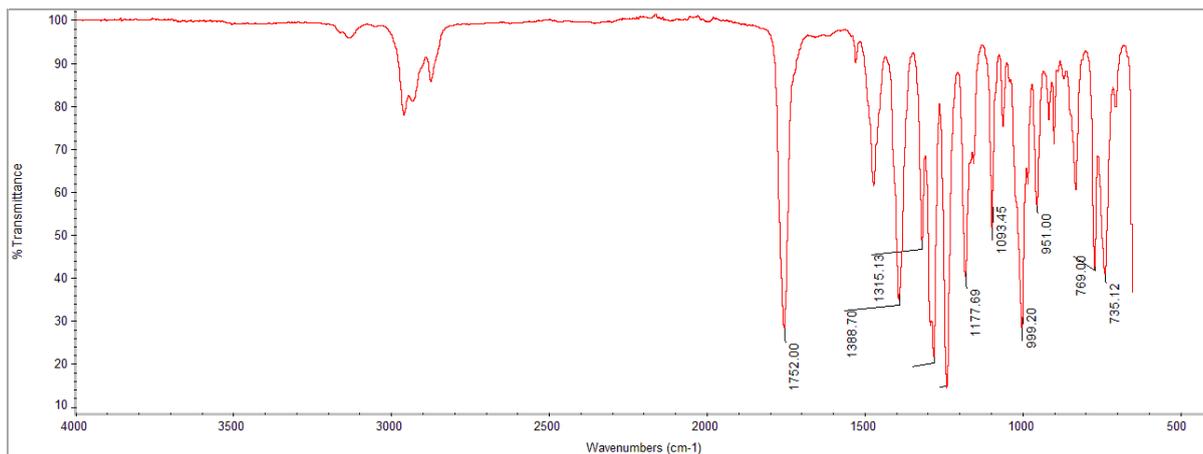


Figura A2.3. FTIR compuesto 1b.

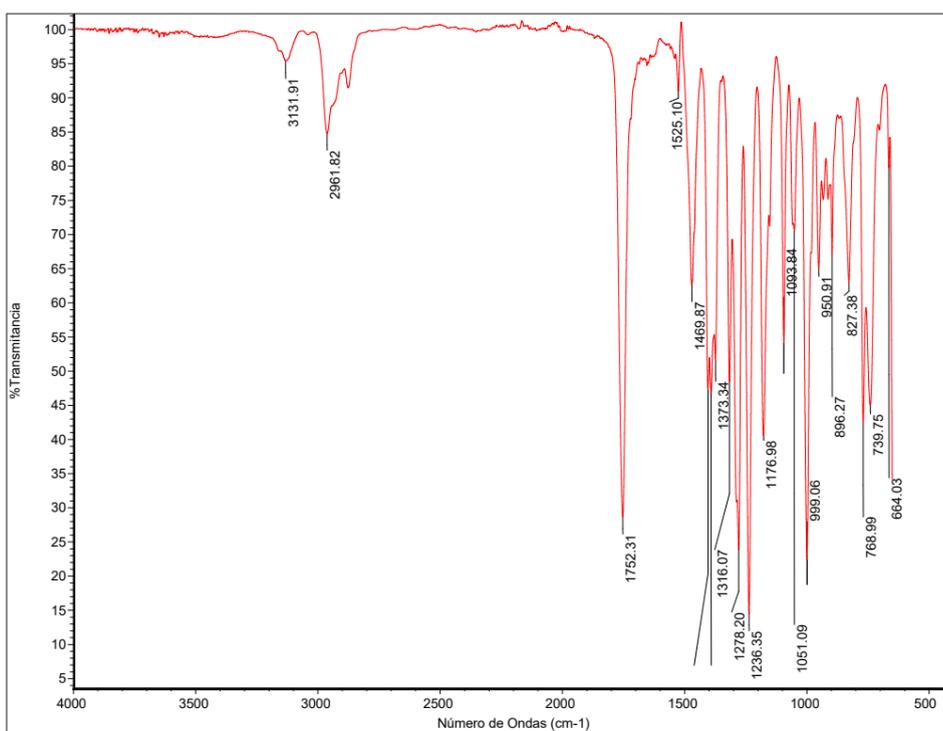


Figura A2.4. FTIR compuesto 1c.

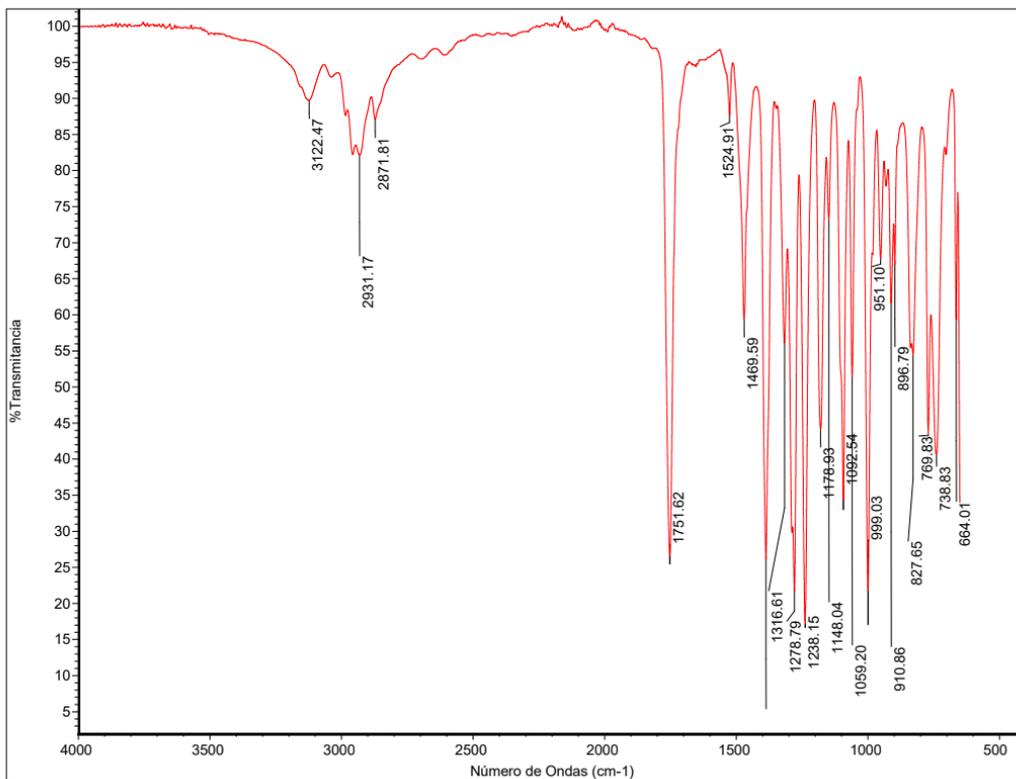


Figura A2.5. FTIR compuesto 1d.

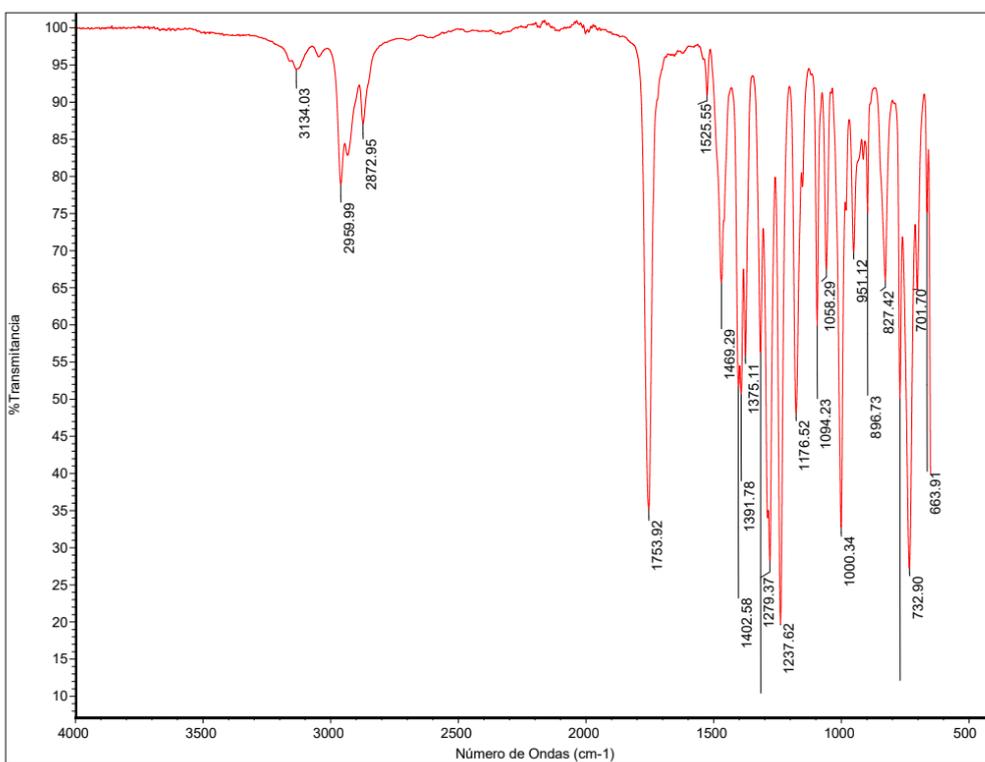


Figura A2.6. FTIR compuesto 1e.

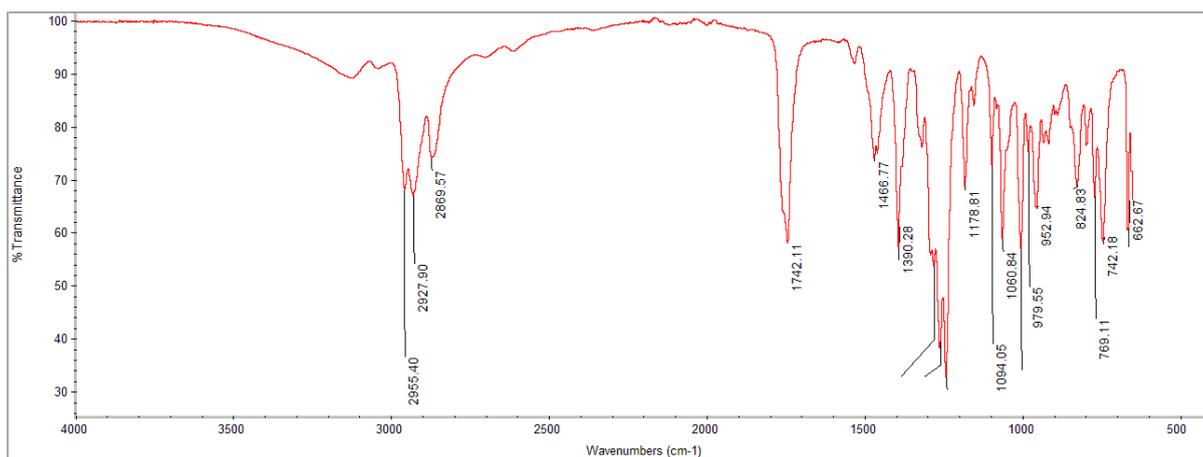


Figura A2.7. FTIR compuesto 1f.

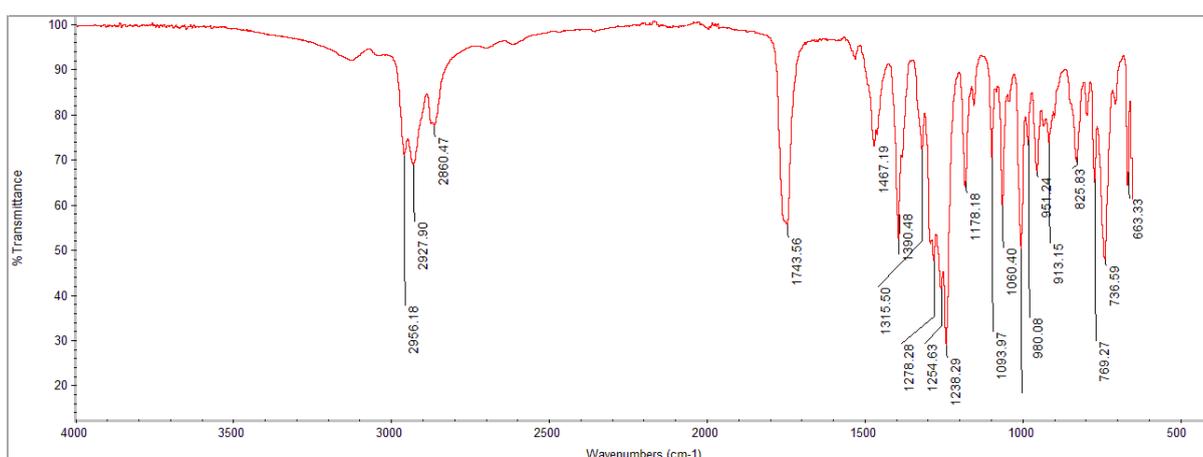


Figura A2.8. FTIR compuesto 1g.

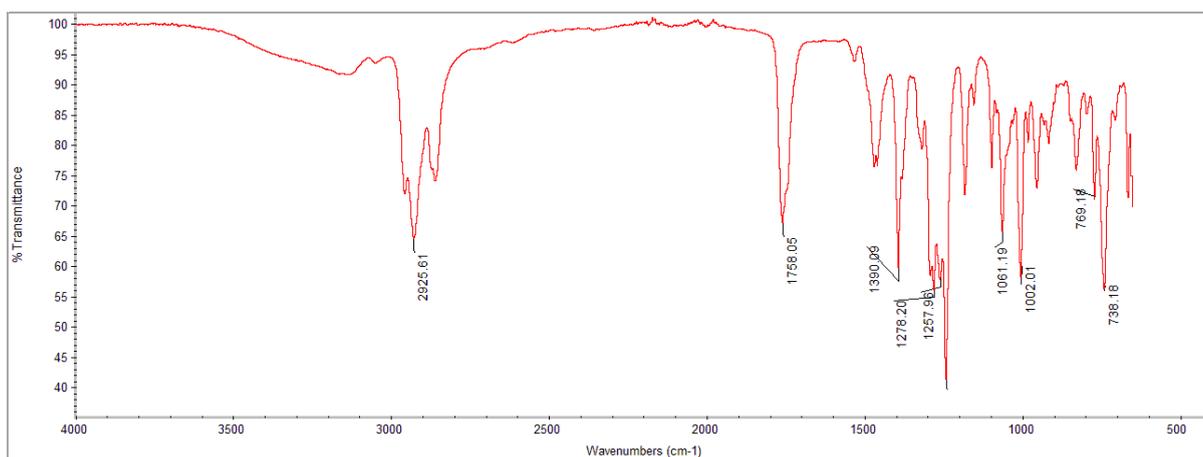


Figura A2.9. FTIR compuesto 1h.

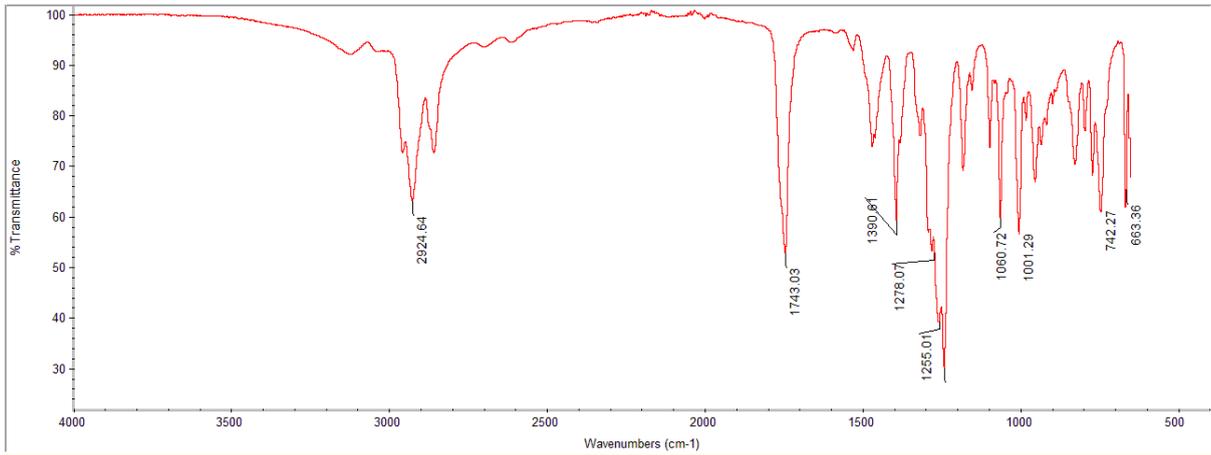


Figura A2.10. FTIR compuesto 1i.

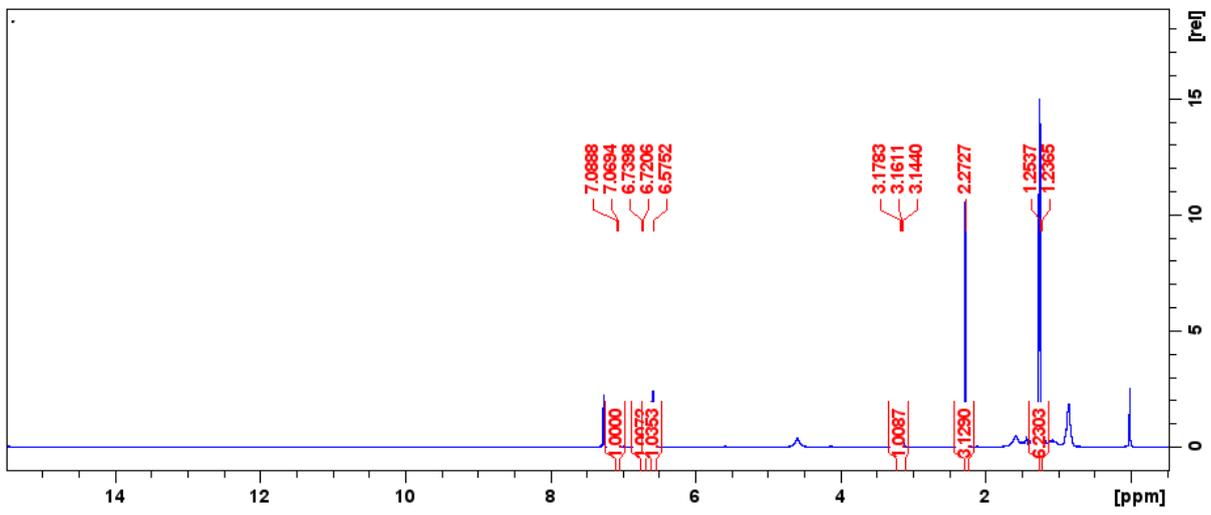


Figura A2.11. FTIR Timol (2).

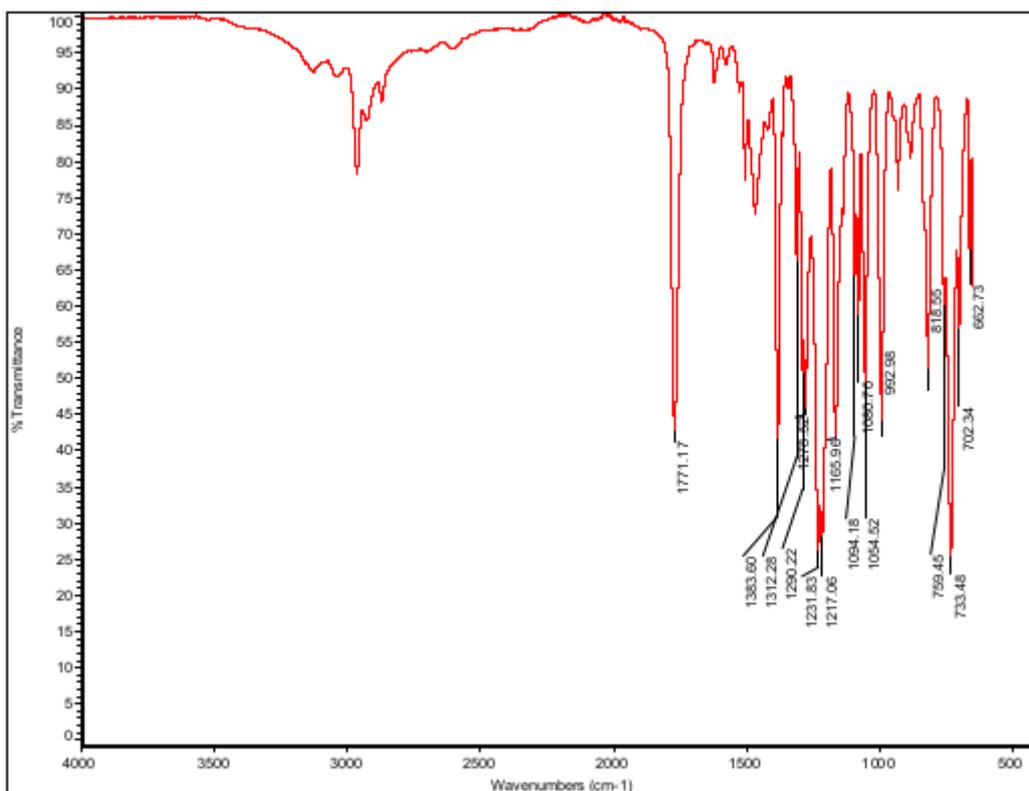


Figura A2.12. FTIR compuesto 2a.

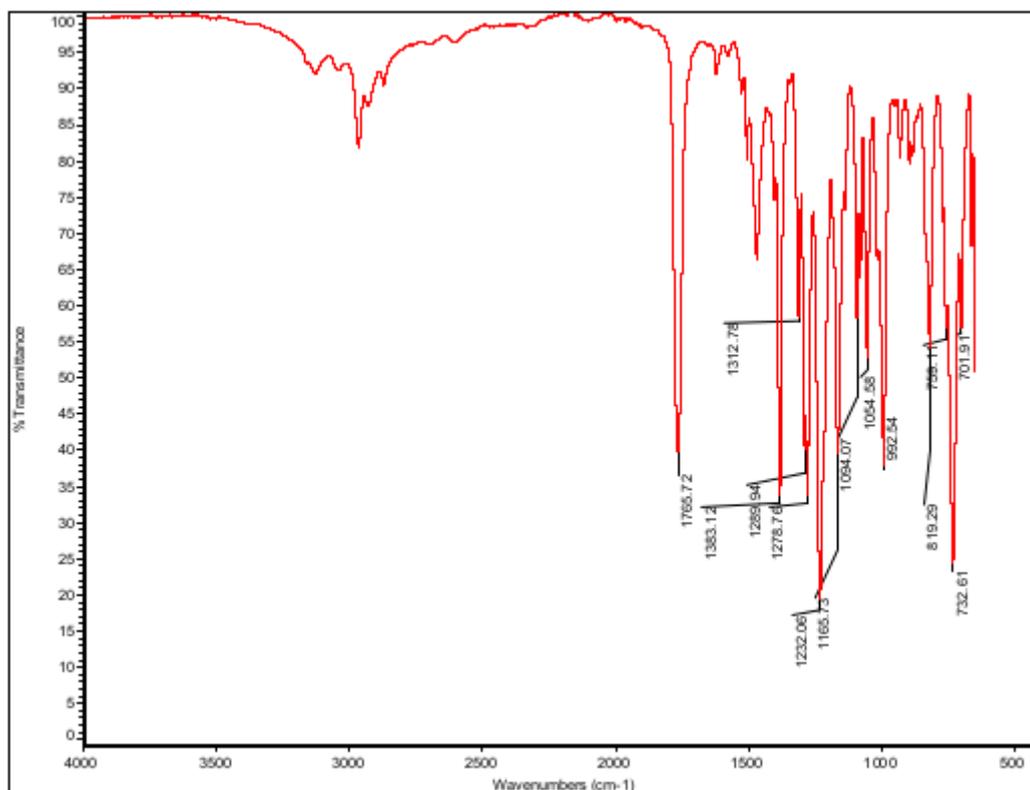


Figura A2.13. FTIR compuesto 2b.

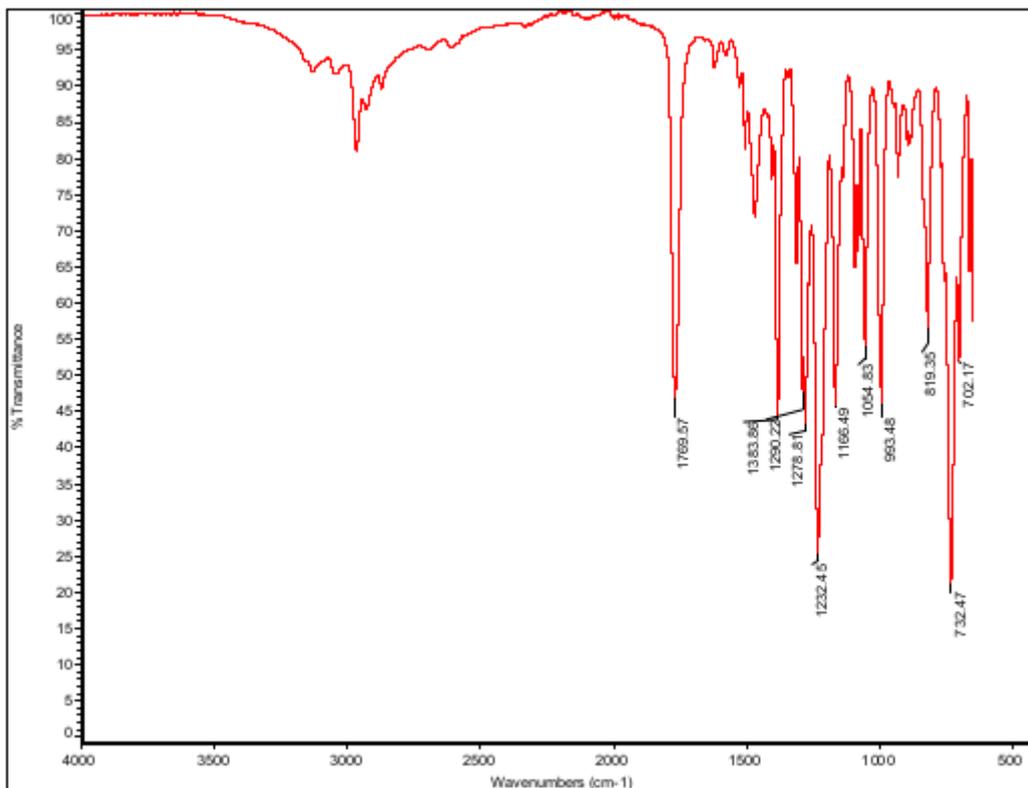


Figura A2.14. FTIR compuesto 2c.

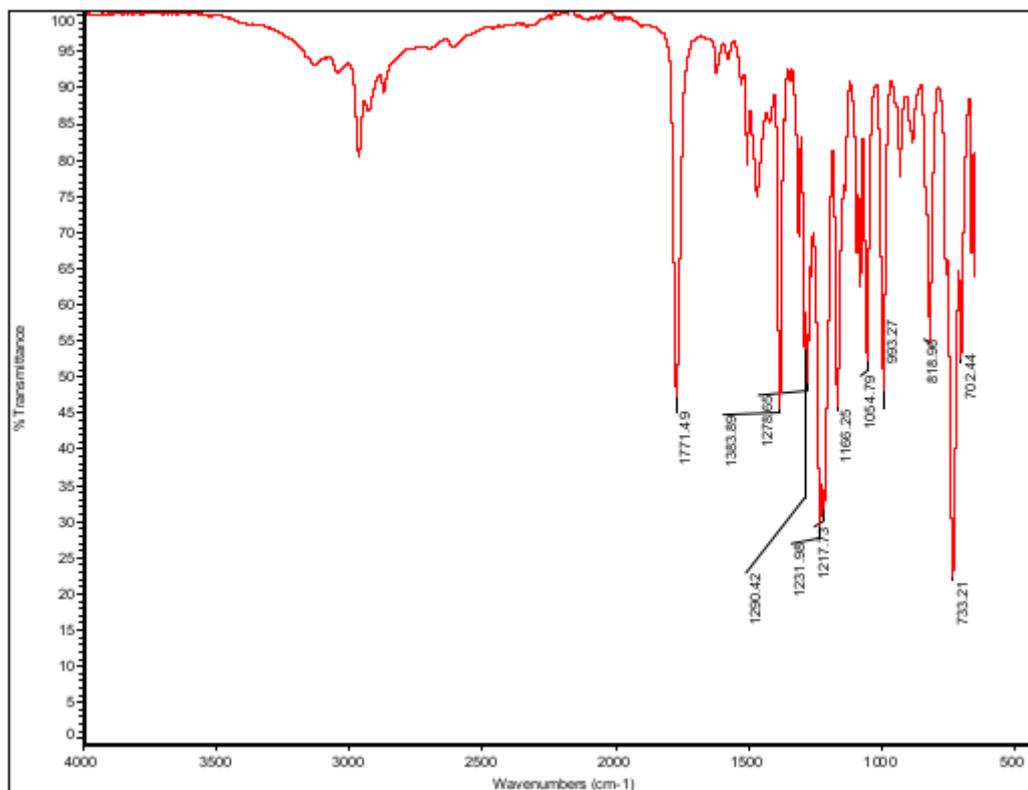


Figura A2.15. FTIR compuesto 2d.

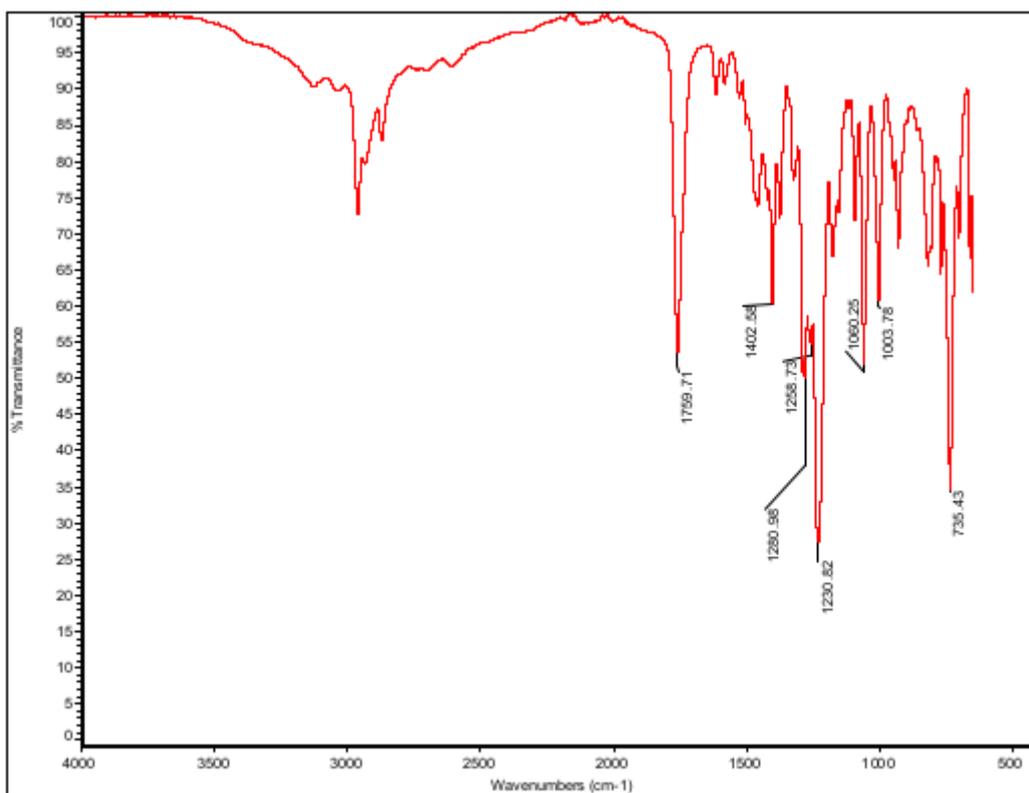


Figura A2.16. FTIR compuesto 2e.

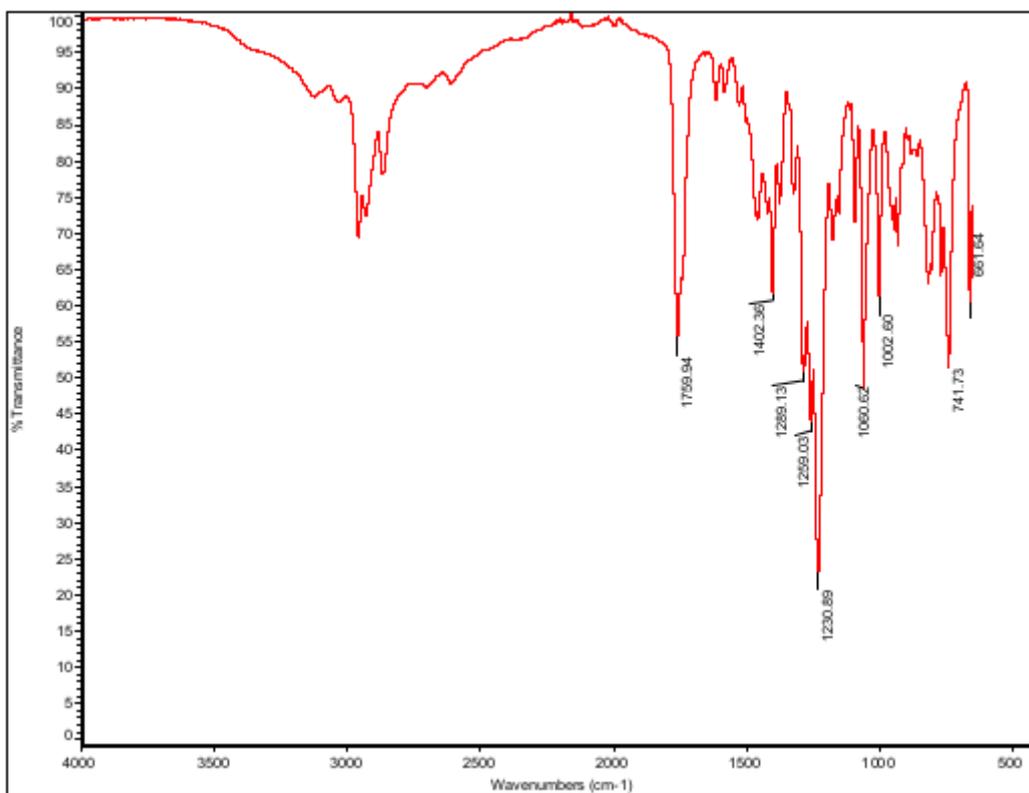


Figura A2.17. FTIR compuesto 2f.

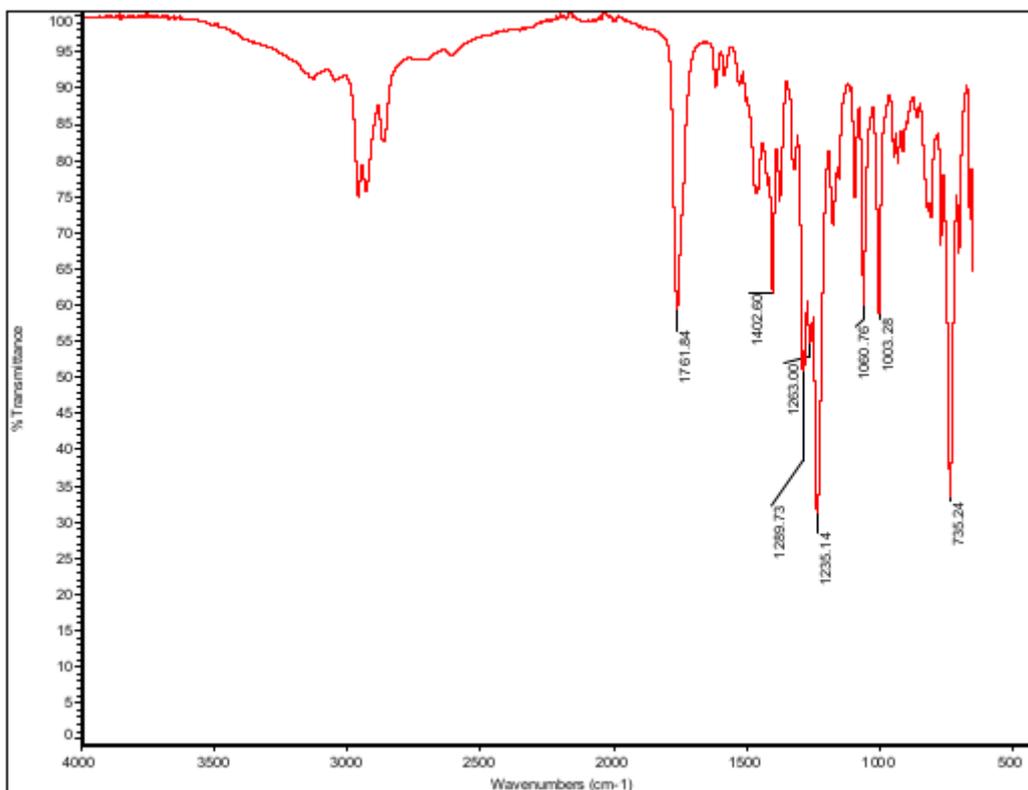


Figura A2.18. FTIR compuesto 2g.

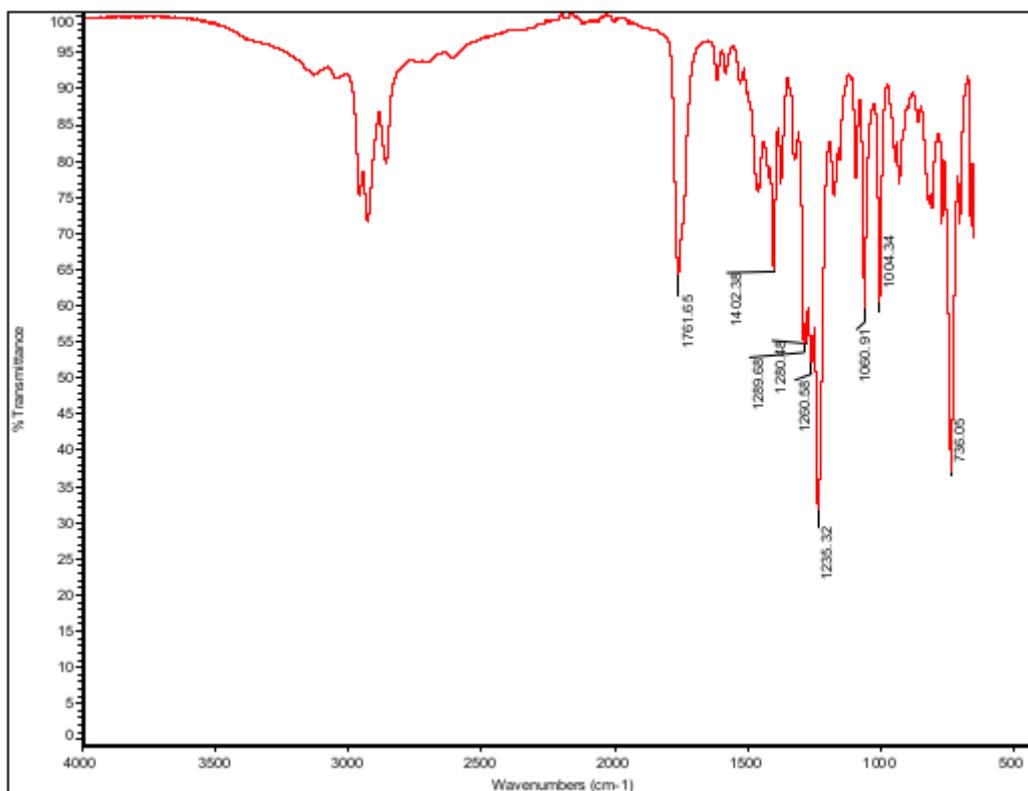


Figura A2.19. FTIR compuesto 2h.

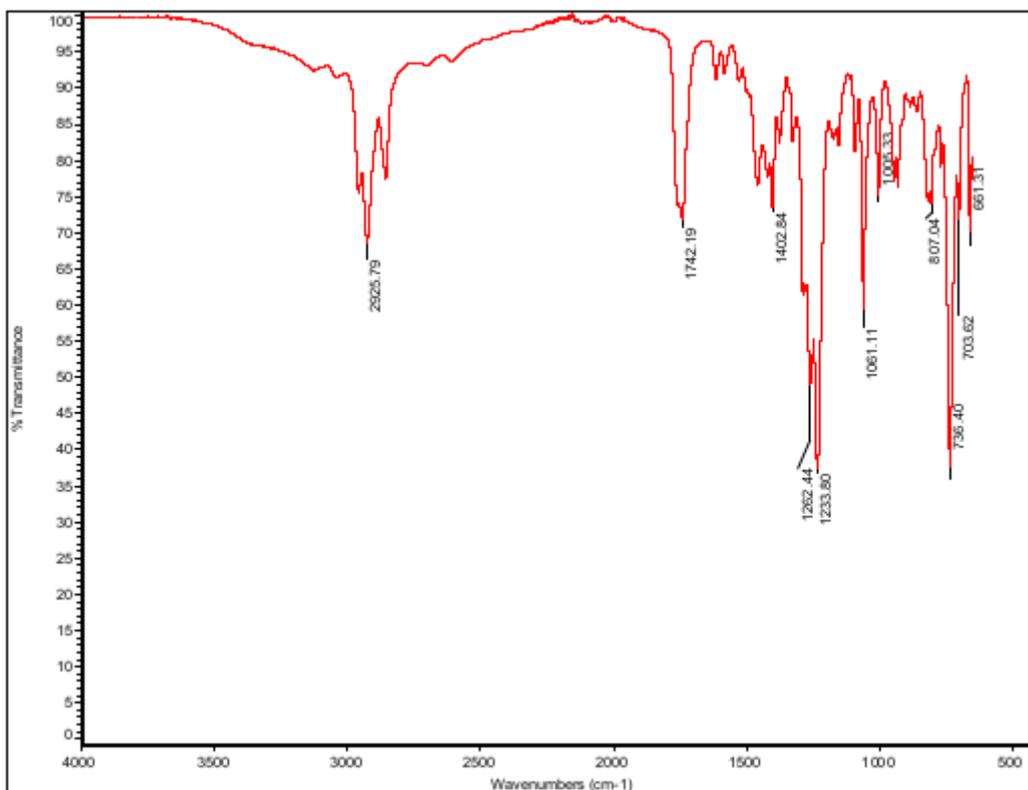


Figura A2.20. FTIR compuesto 2i.

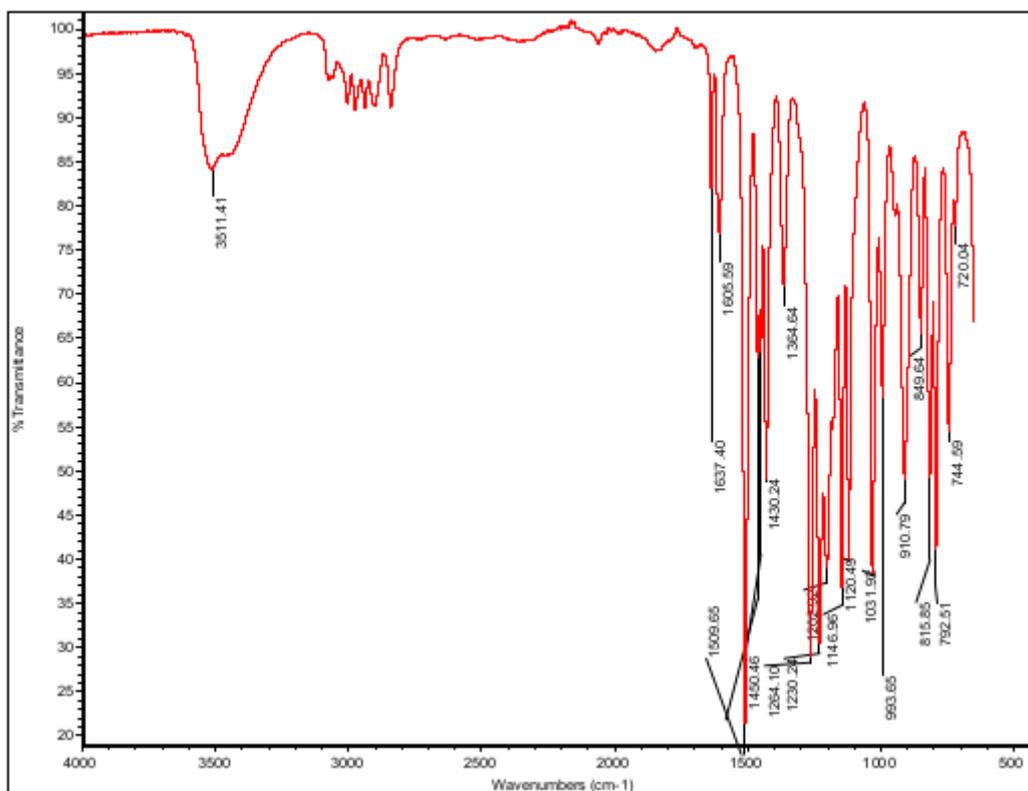


Figura A2.21. FTIR Eugenol (3).

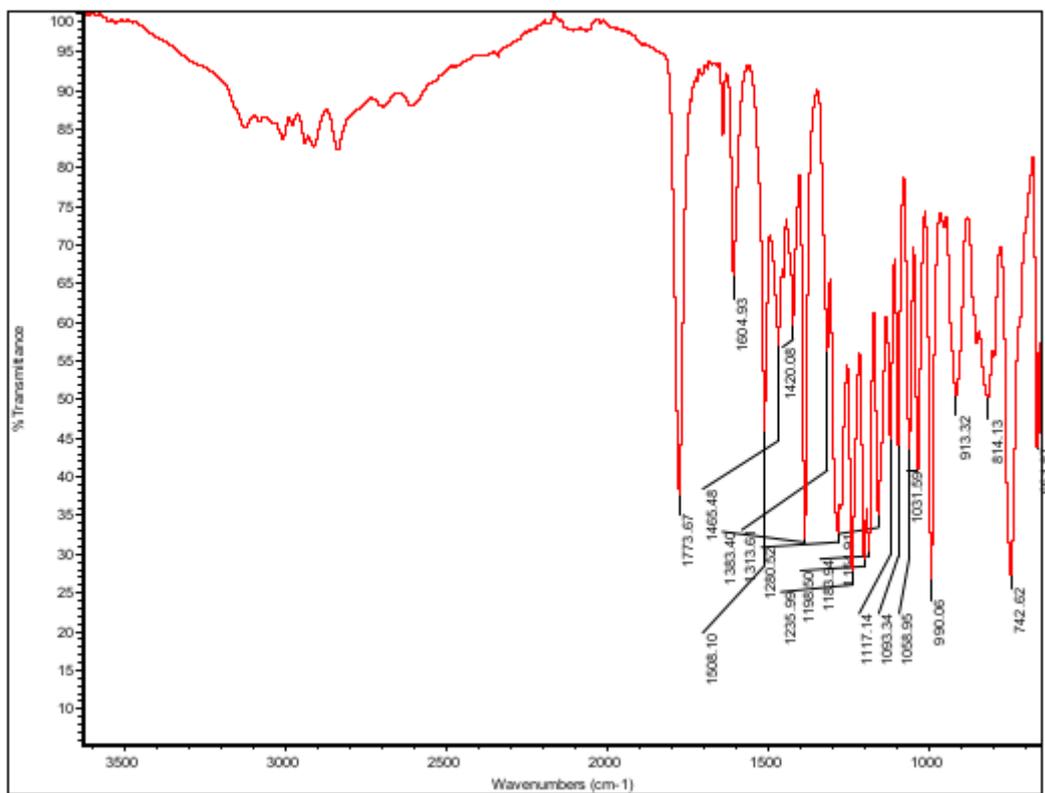


Figura A2.22. FTIR compuesto 3a.

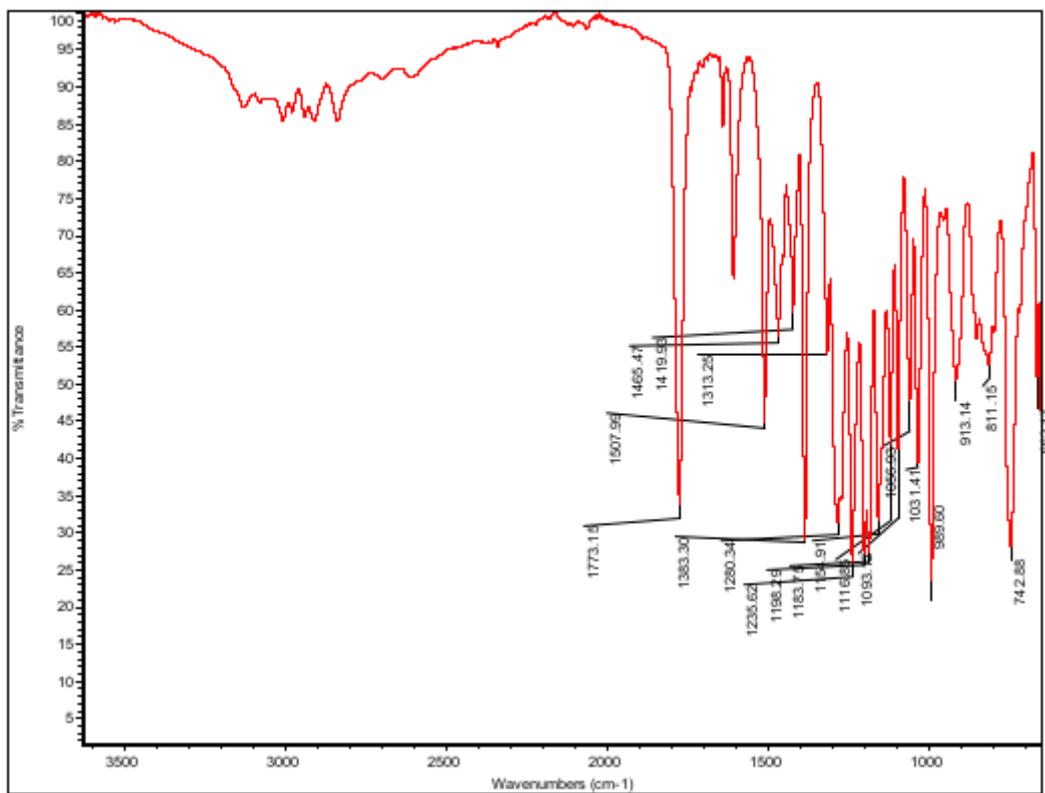


Figura A2.23. FTIR compuesto 3b.

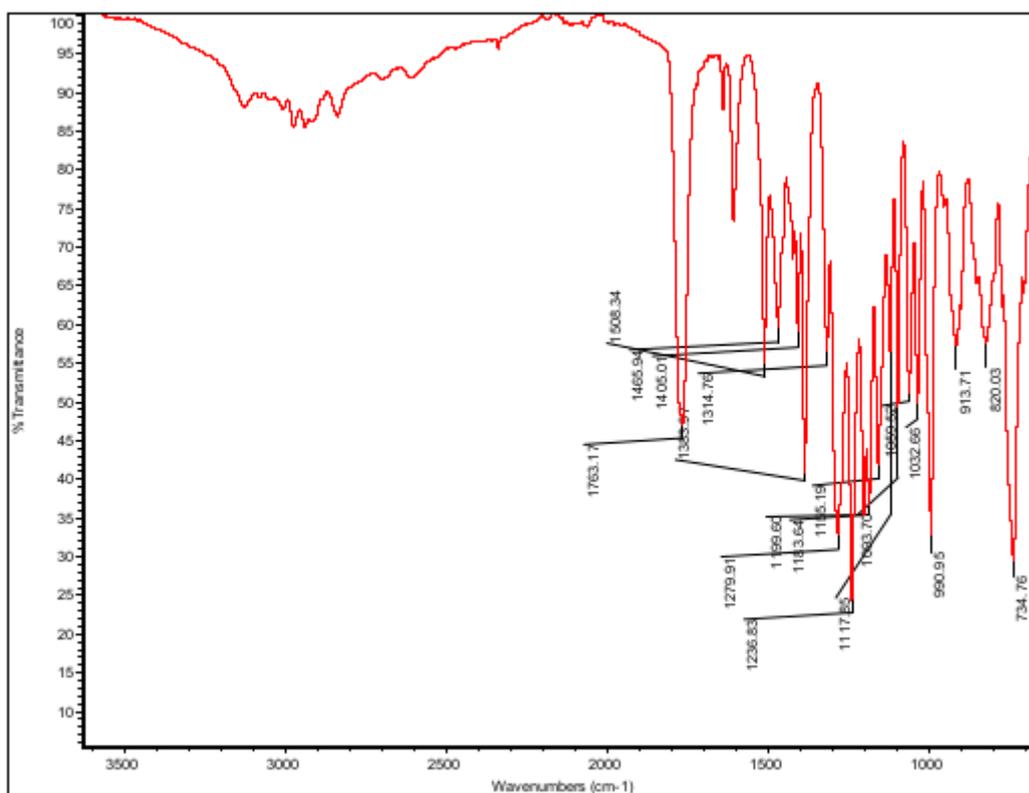


Figura A2.24. FTIR compuesto 3c.

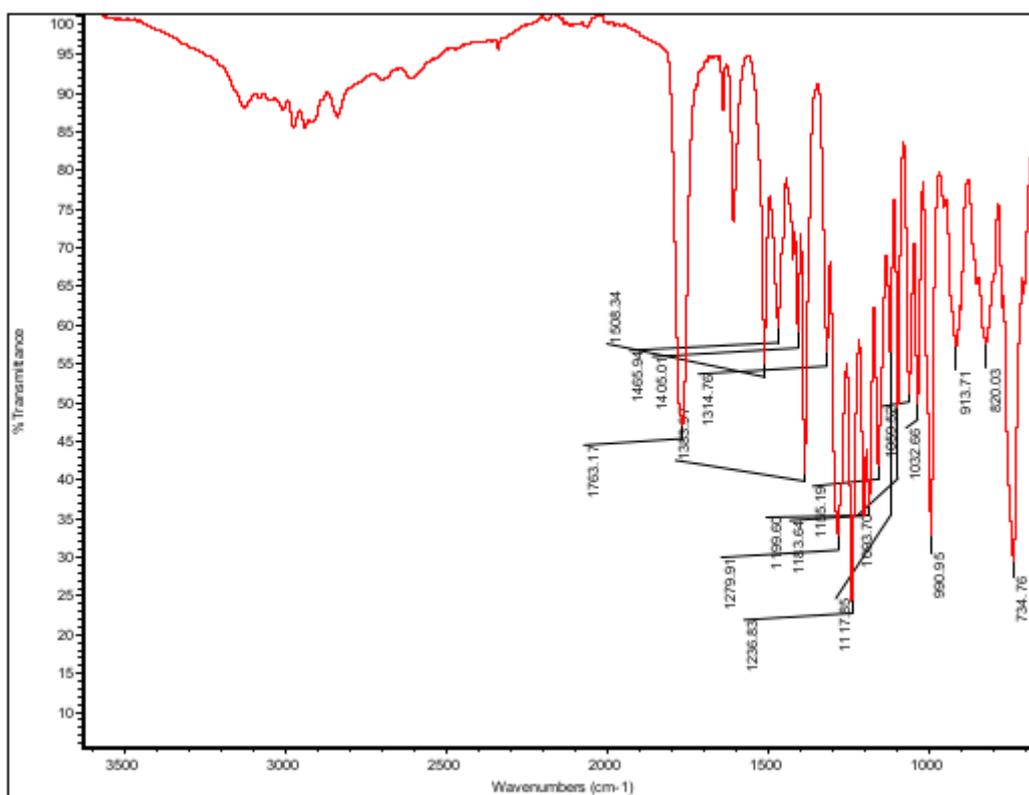


Figura A2.25. FTIR compuesto 3d.

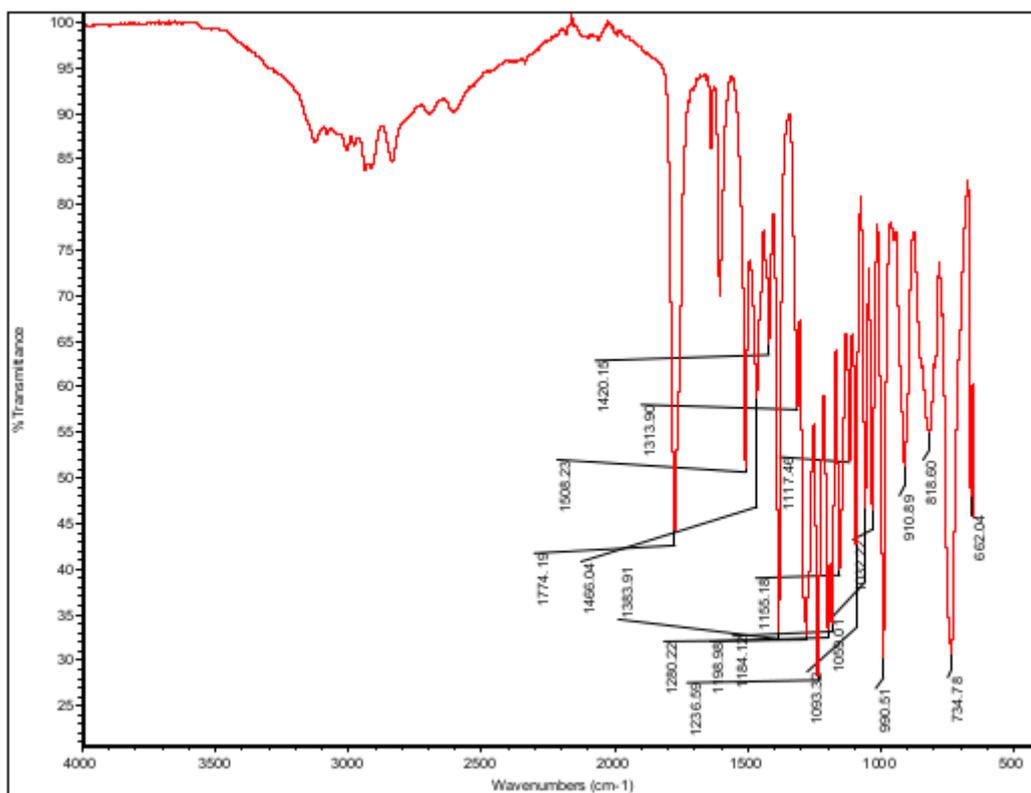


Figura A2.26. FTIR compuesto 3e.

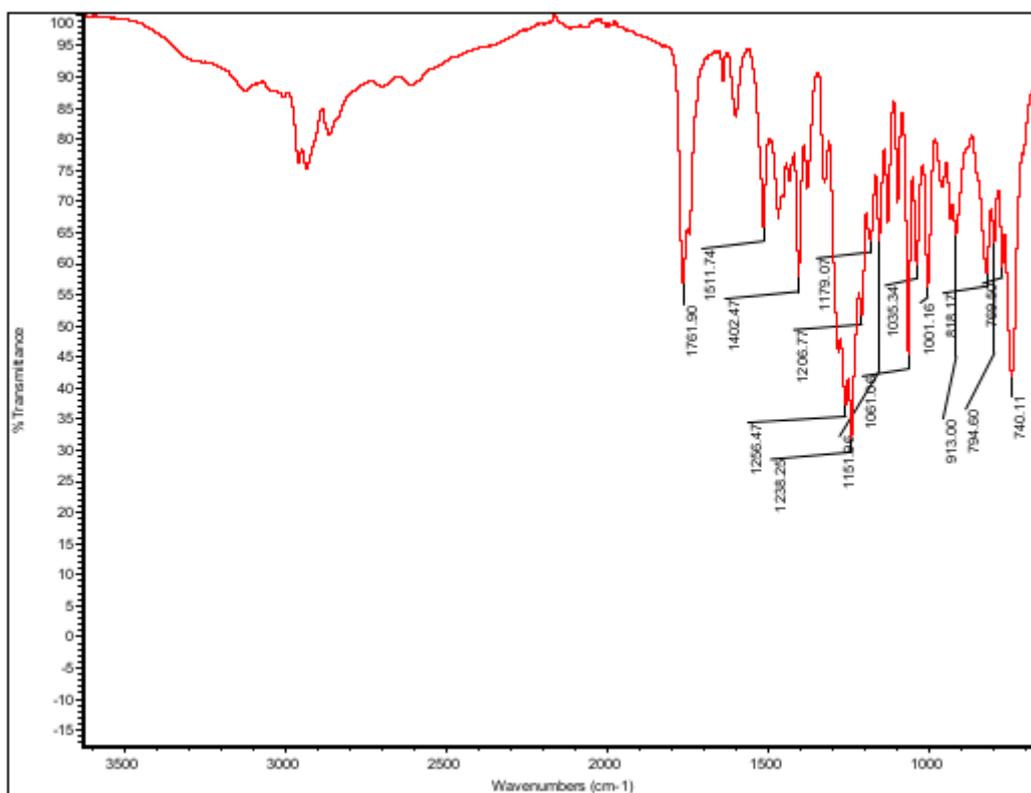


Figura A2.27. FTIR compuesto 3f.

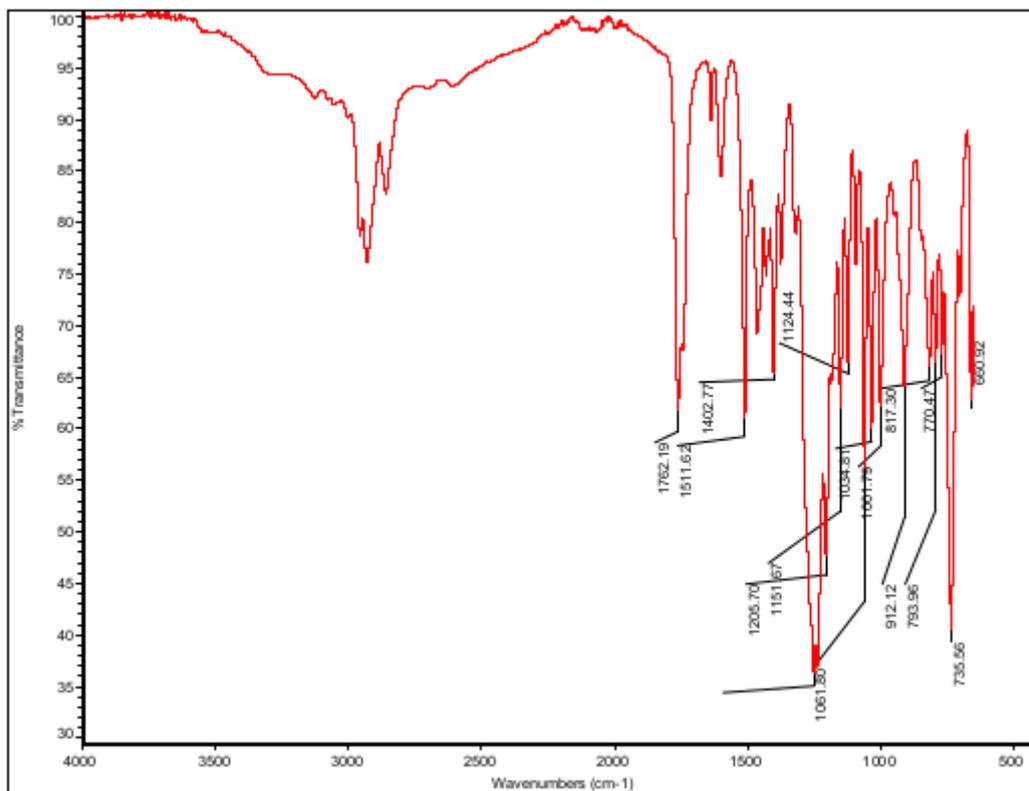


Figura A2.28. FTIR compuesto 3g.

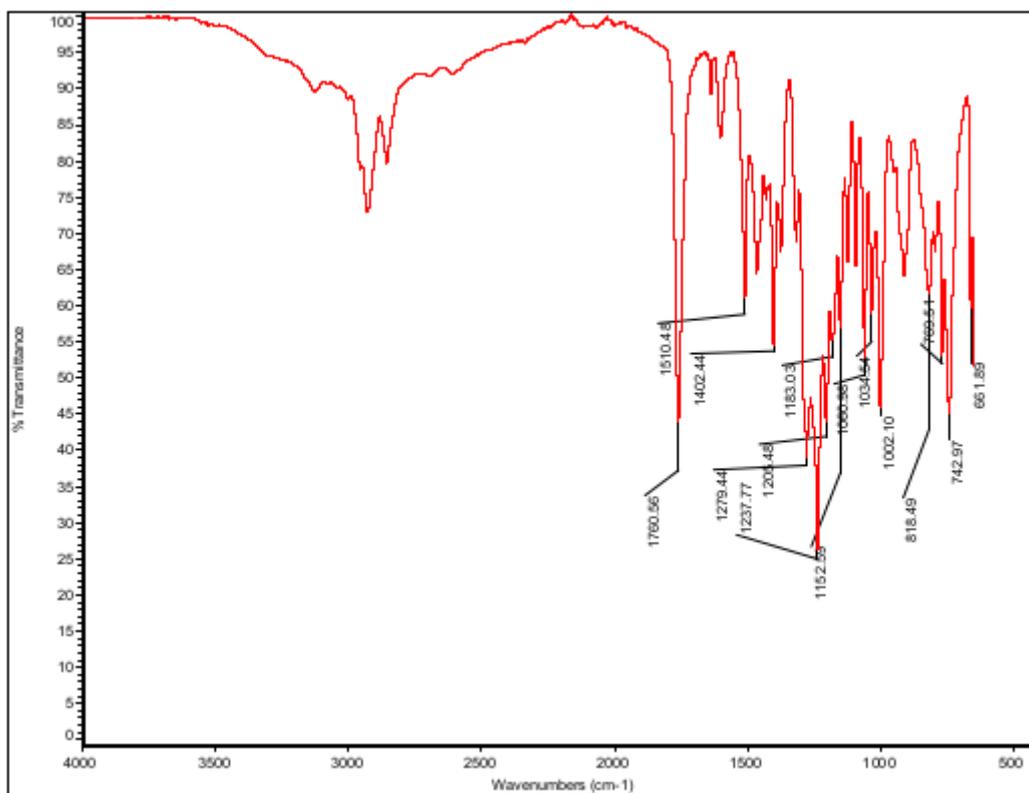


Figura A2.29. FTIR compuesto 3h.

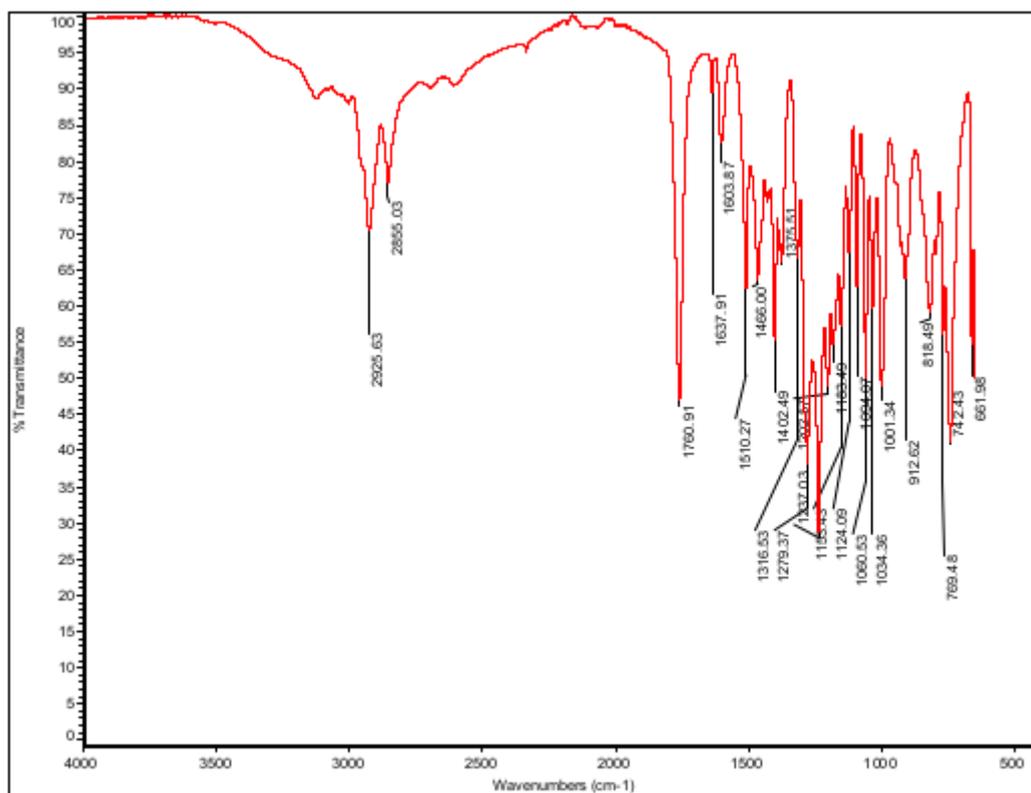


Figura A2.30. FTIR compuesto 3i.

Anexo III

Resultados de Espectroscopía de Masas de Alta Resolución

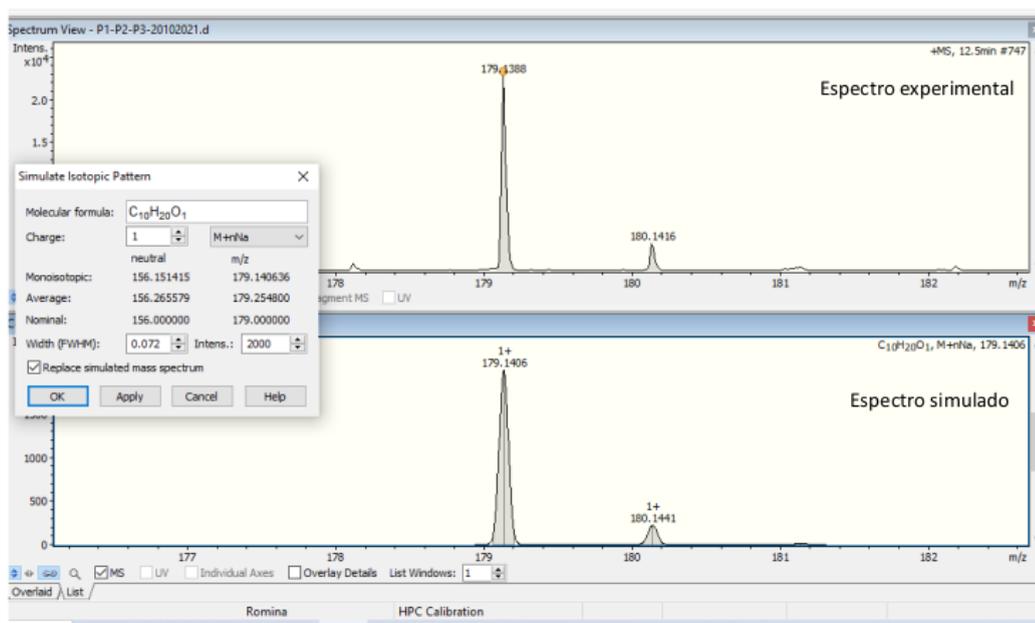


Figura A3.1. HRMS Mentol (1).

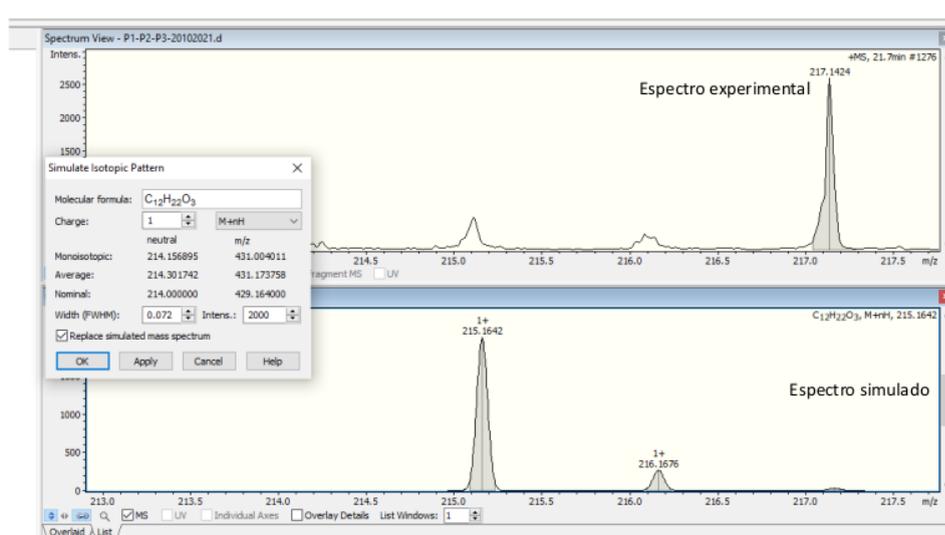


Figura A3.1. HRMS compuesto 1a.

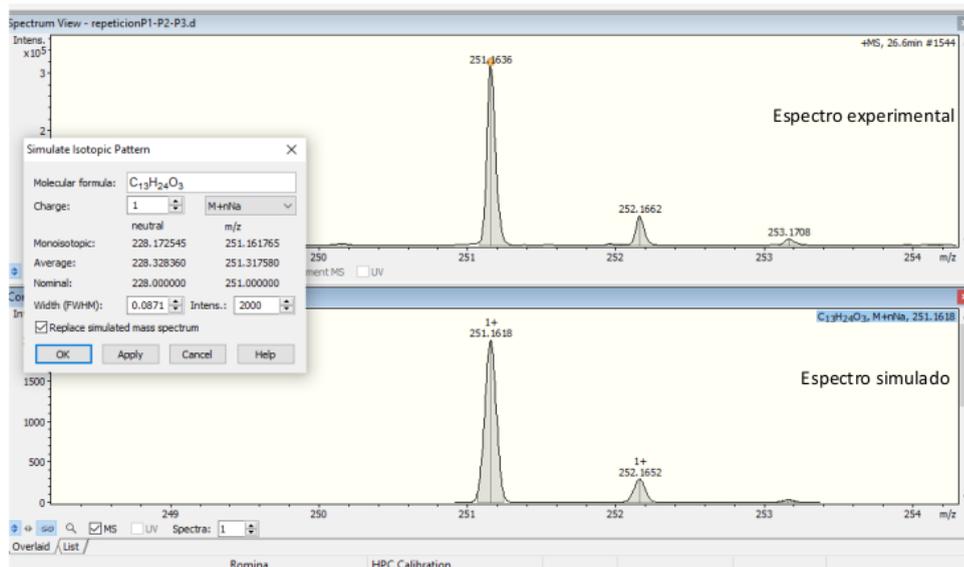


Figura A3.3. HRMS compuesto 1b.

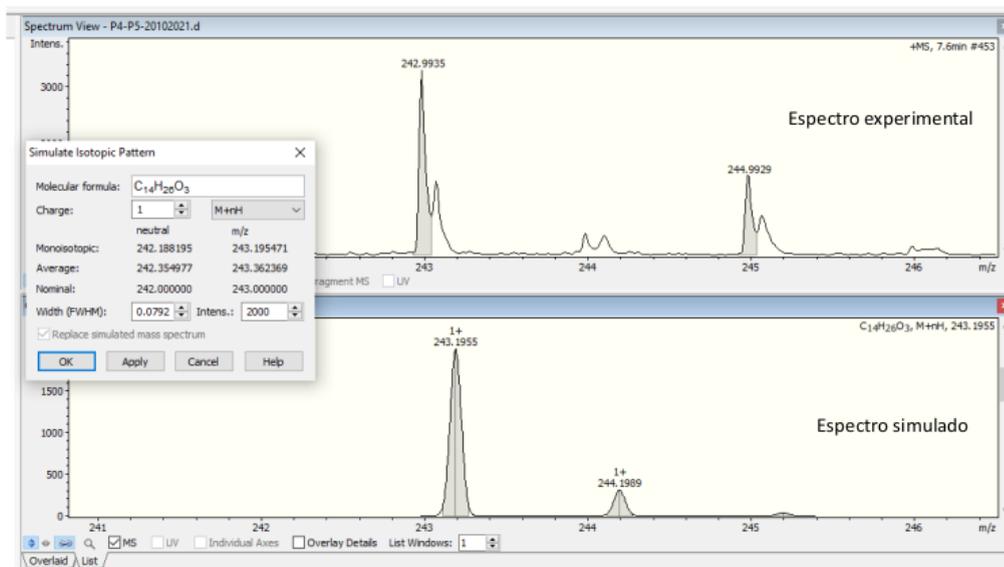


Figura A3.4. HRMS compuesto 1c.

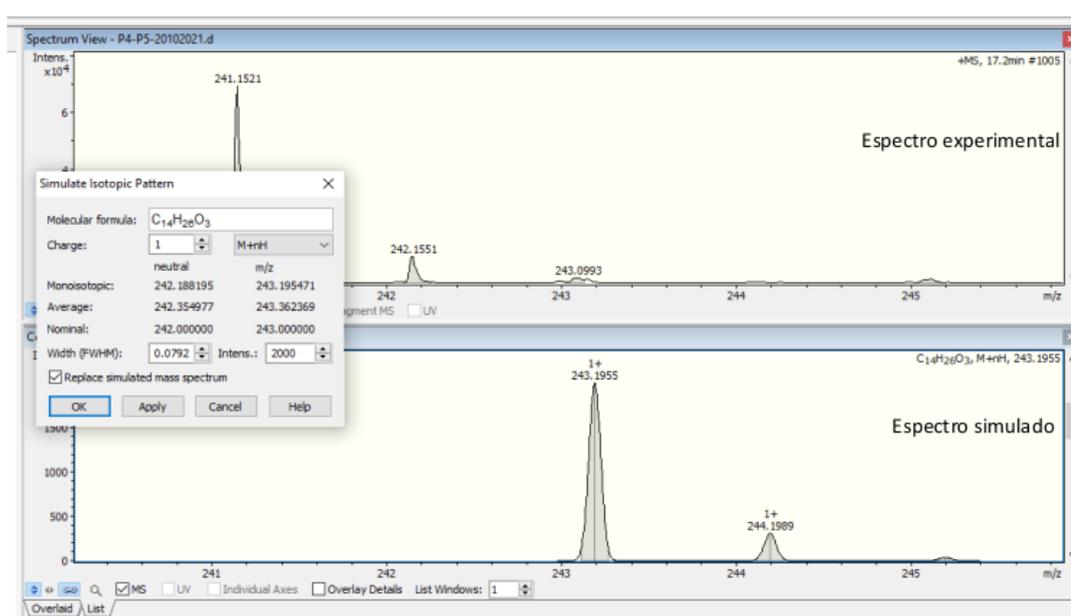


Figura A3.5. HRMS compuesto 1d.

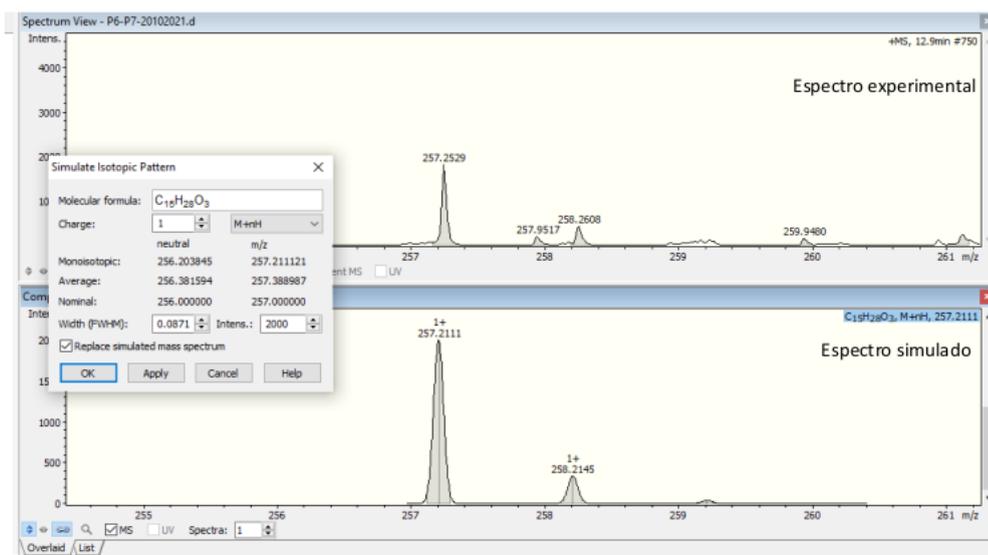


Figura A3.6. HRMS compuesto 1e.

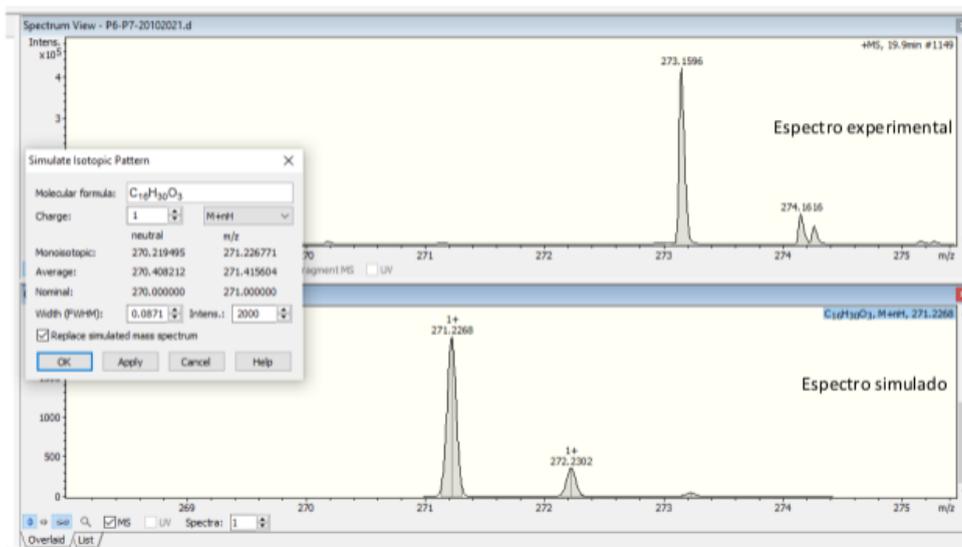


Figura A3.7. HRMS compuesto 1f.

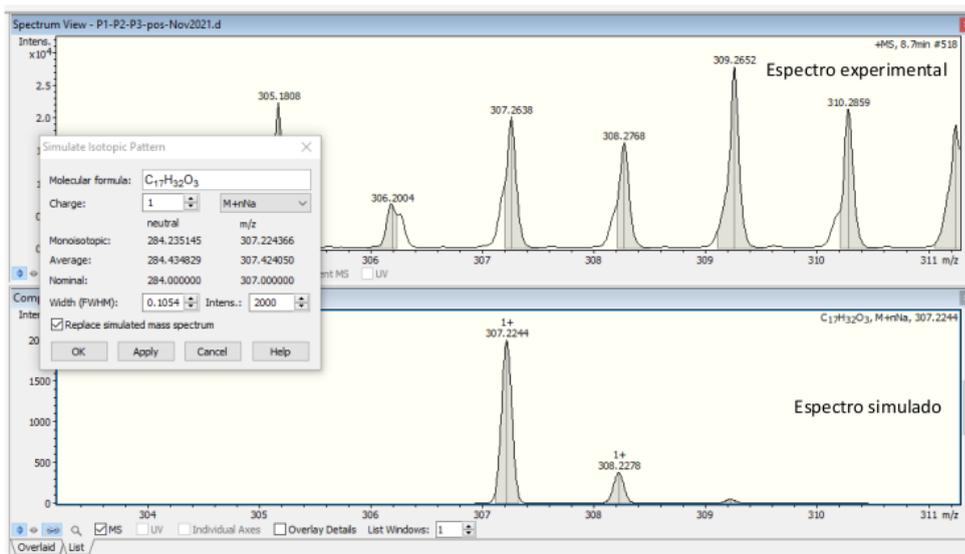


Figura A3.8. HRMS compuesto 1g.

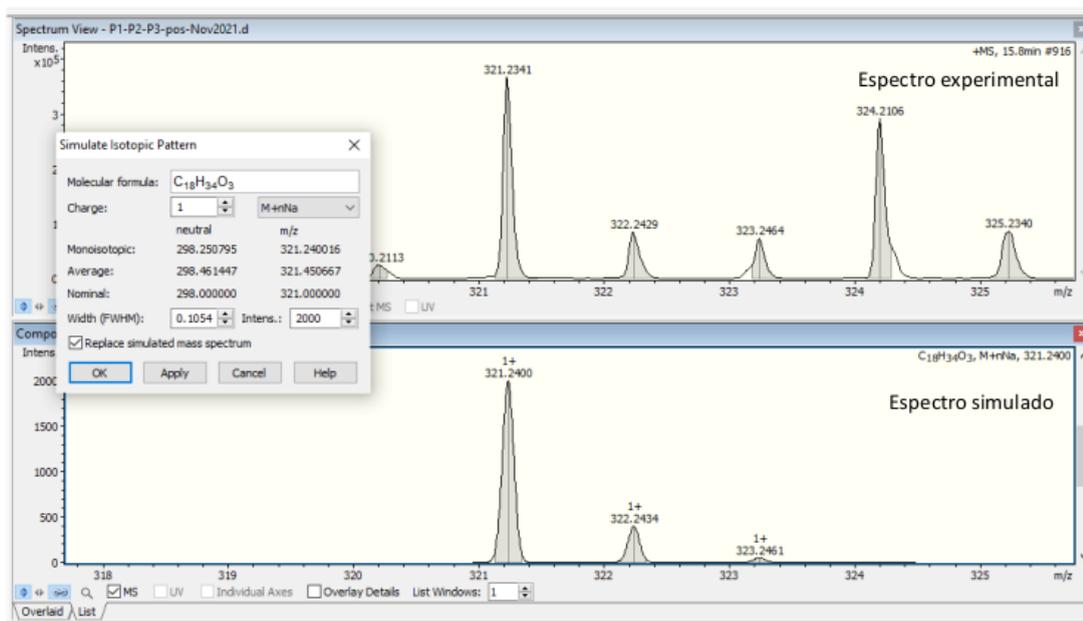


Figura A3.9. HRMS compuesto 1h.

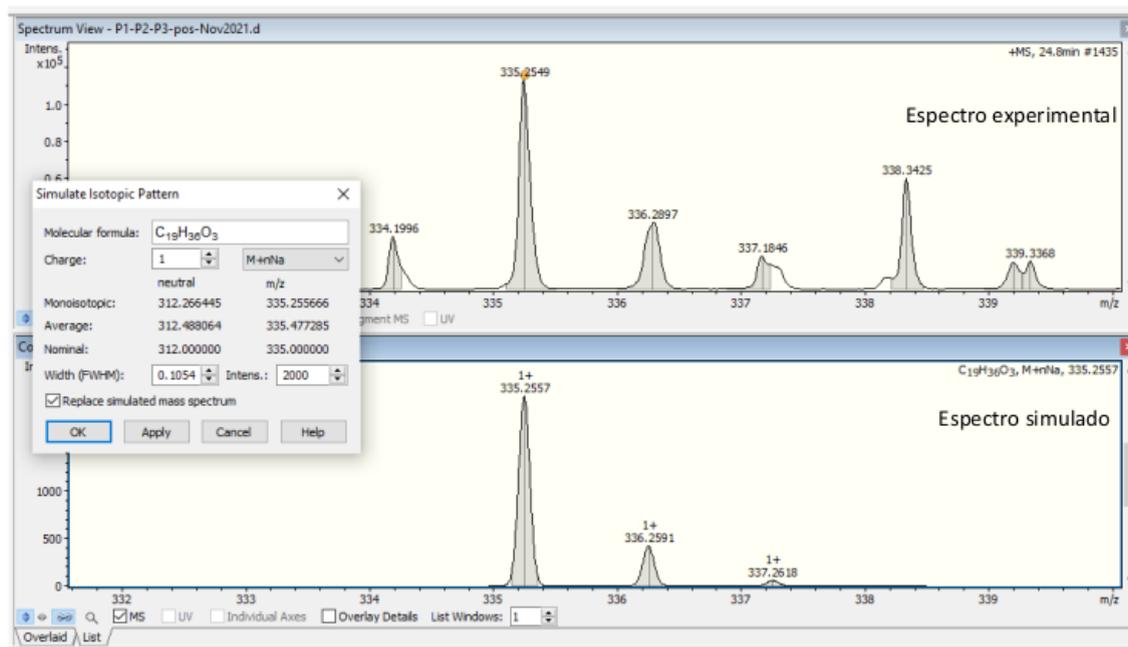


Figura A3.10. HRMS compuesto 1i.

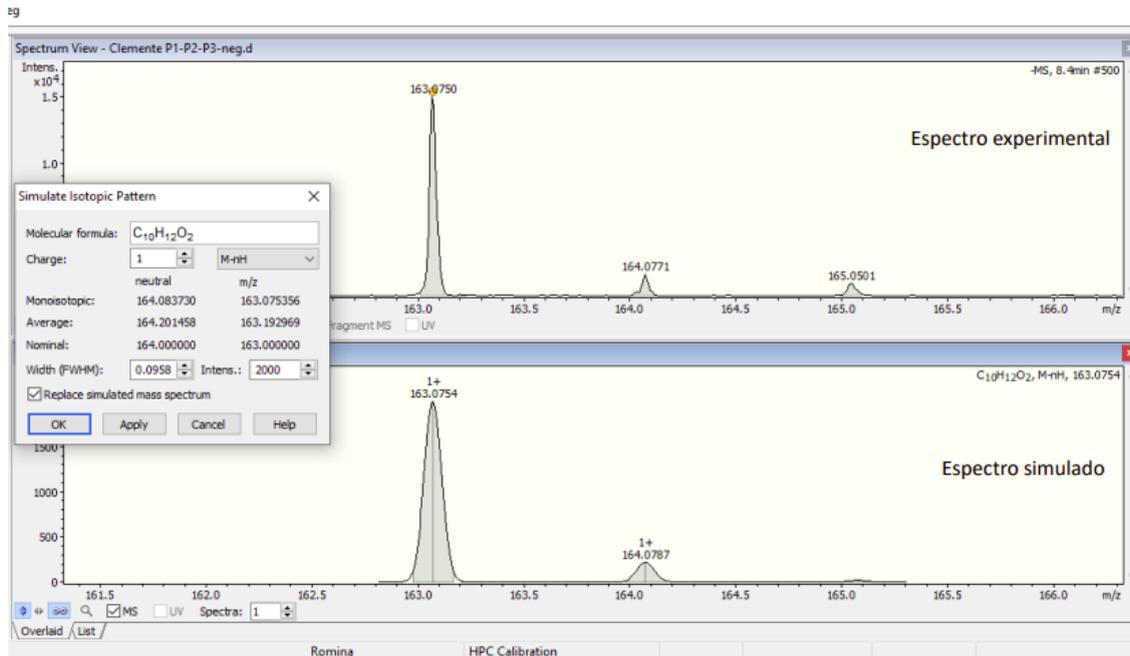


Figura A3.11. HRMS Eugenol (3).

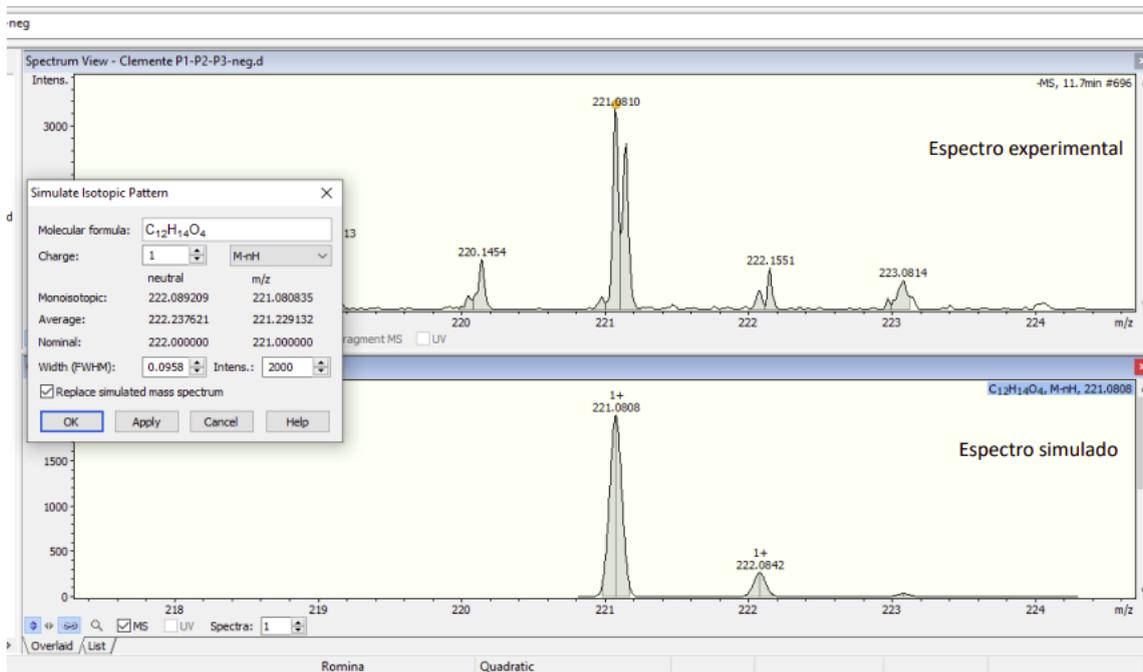


Figura A3.12. HRMS compuesto 3a.

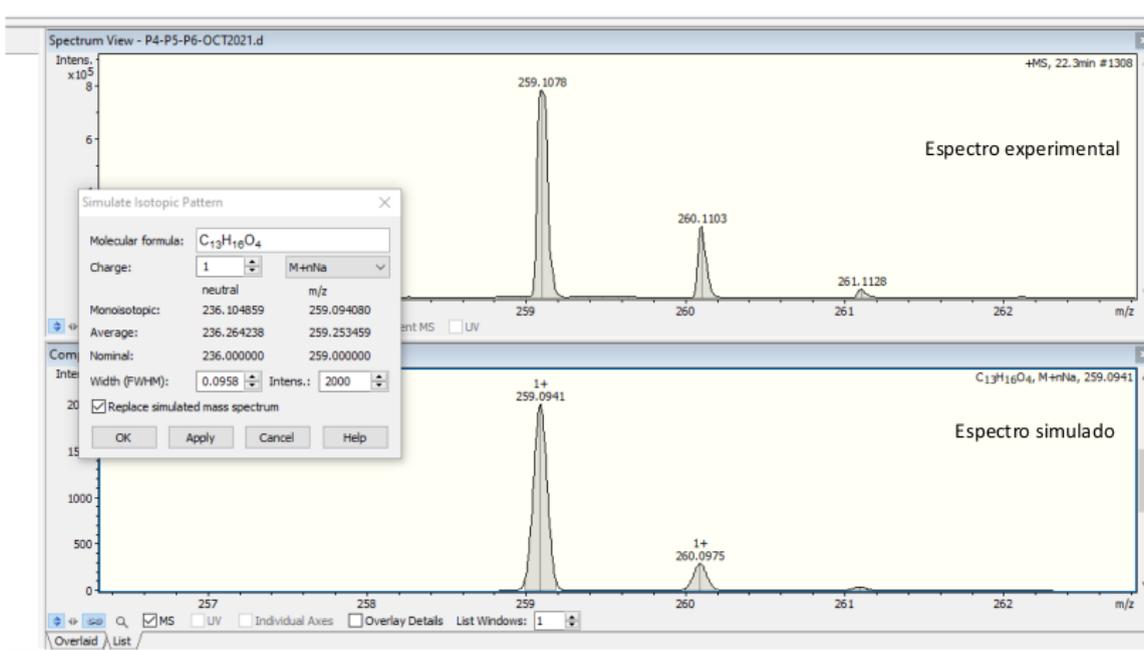


Figura A3.13. HRMS compuesto 3b.

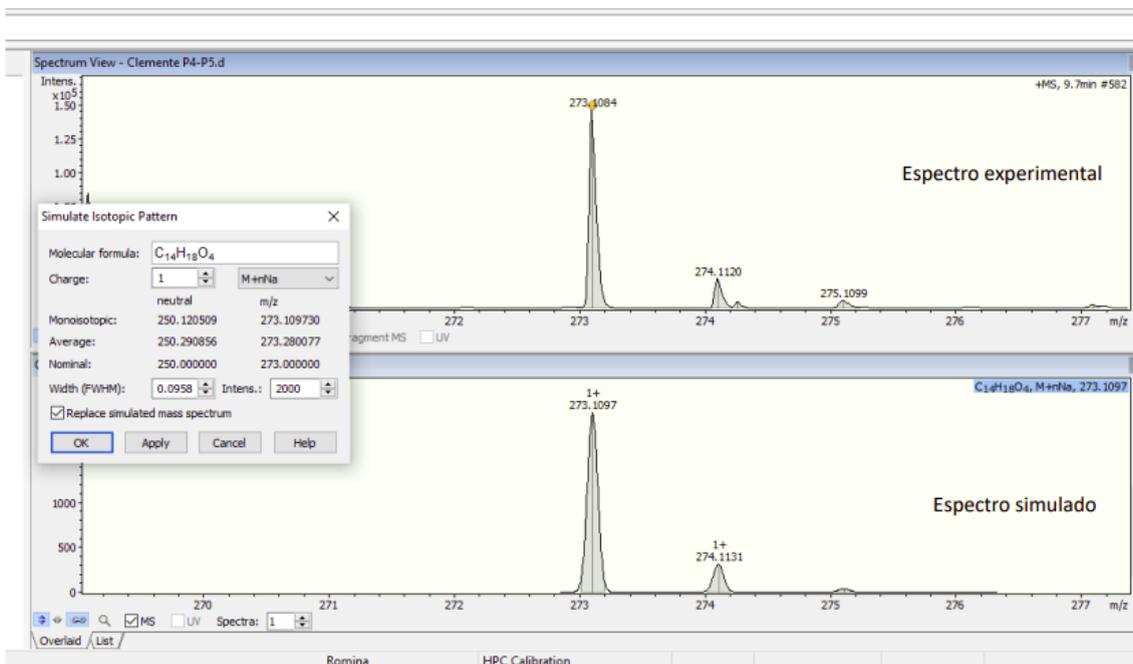


Figura A3.14. HRMS compuesto 3c.

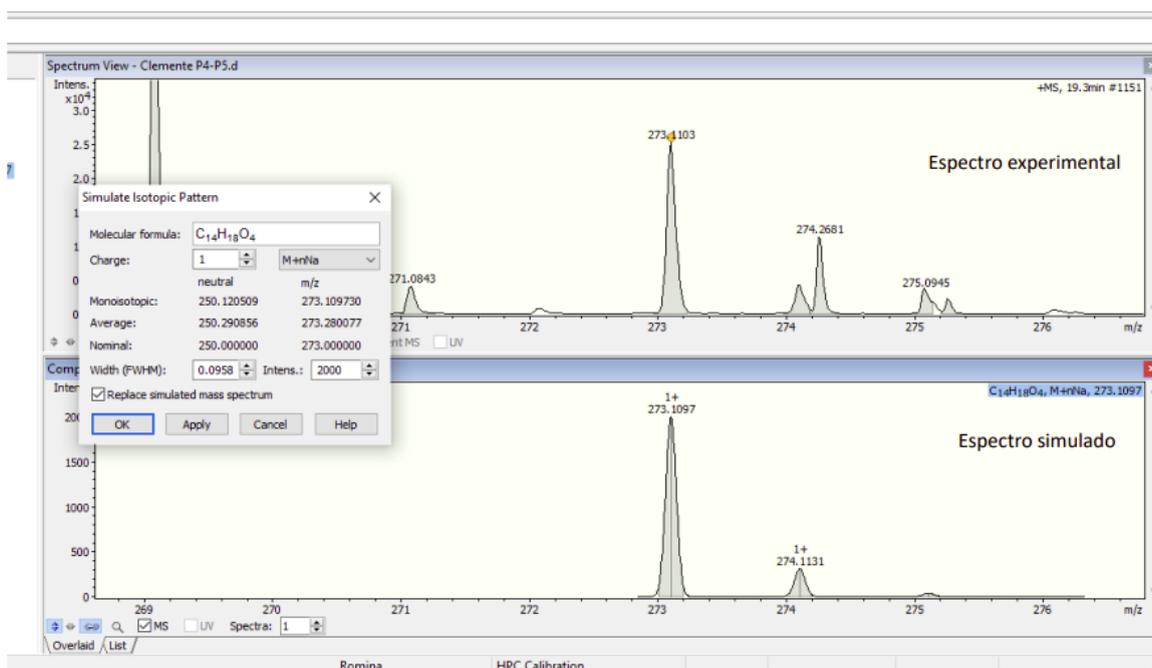


Figura A3.15. HRMS compuesto 3d.

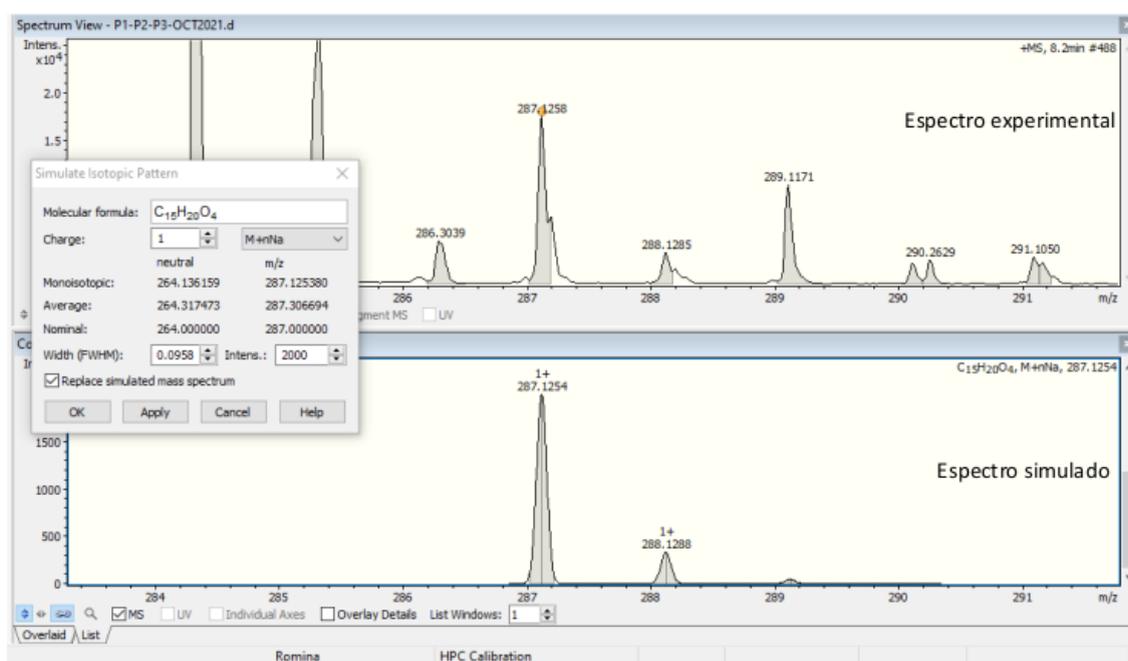


Figura A3.16. HRMS compuesto 3e.

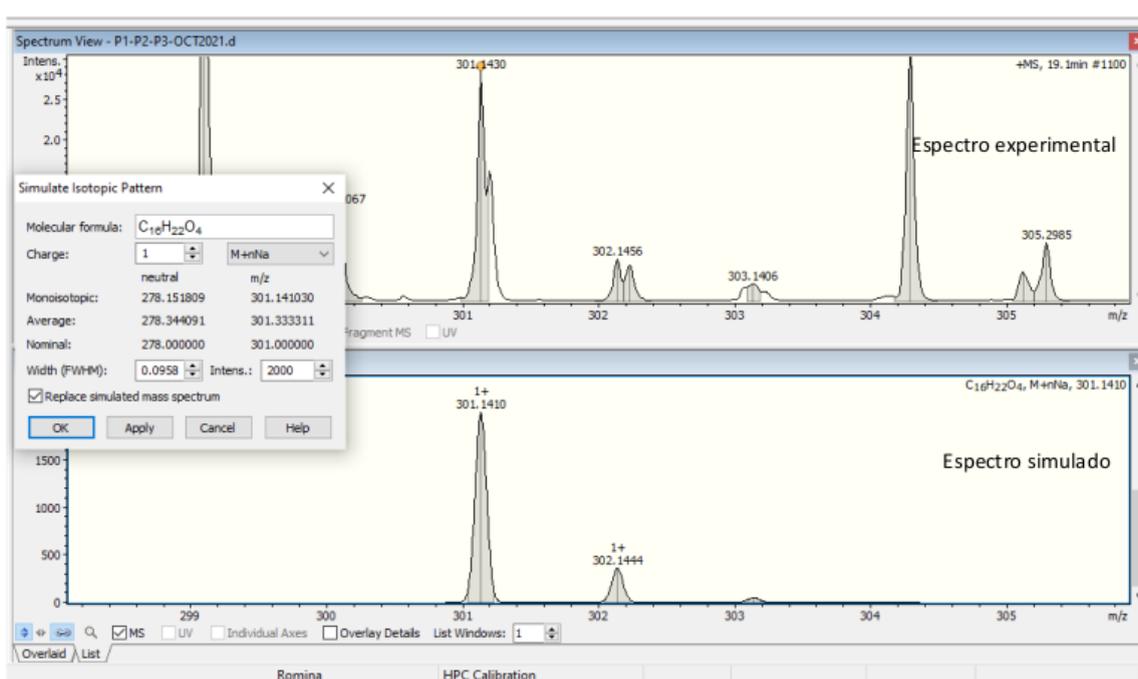


Figura A3.17. HRMS compuesto 3f.

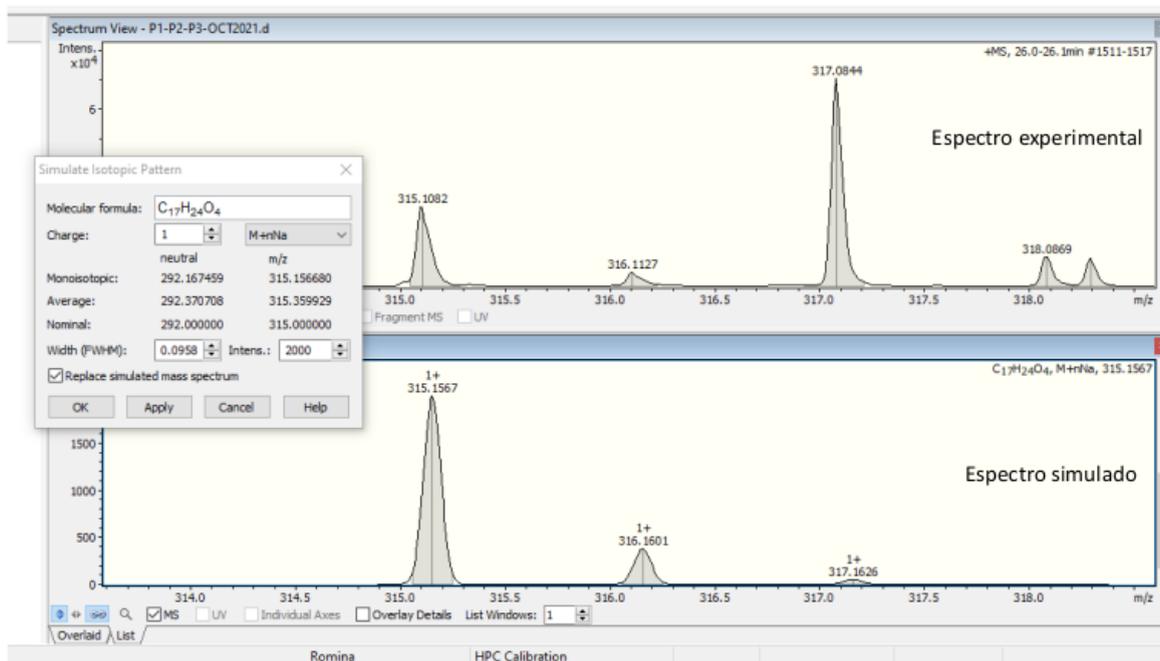


Figura A3.18. HRMS compuesto 3g.

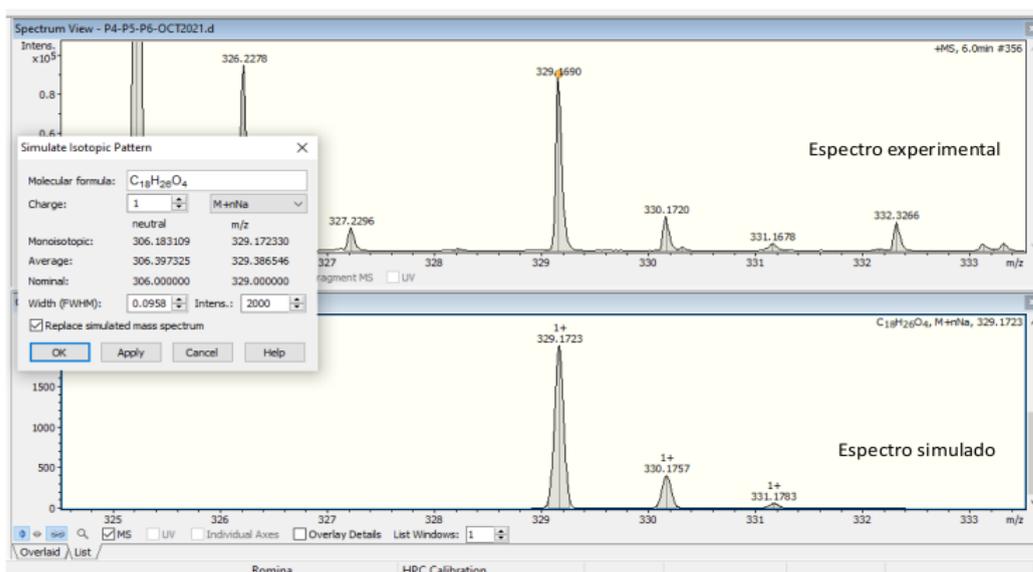


Figura A3.19. HRMS compuesto 3h.

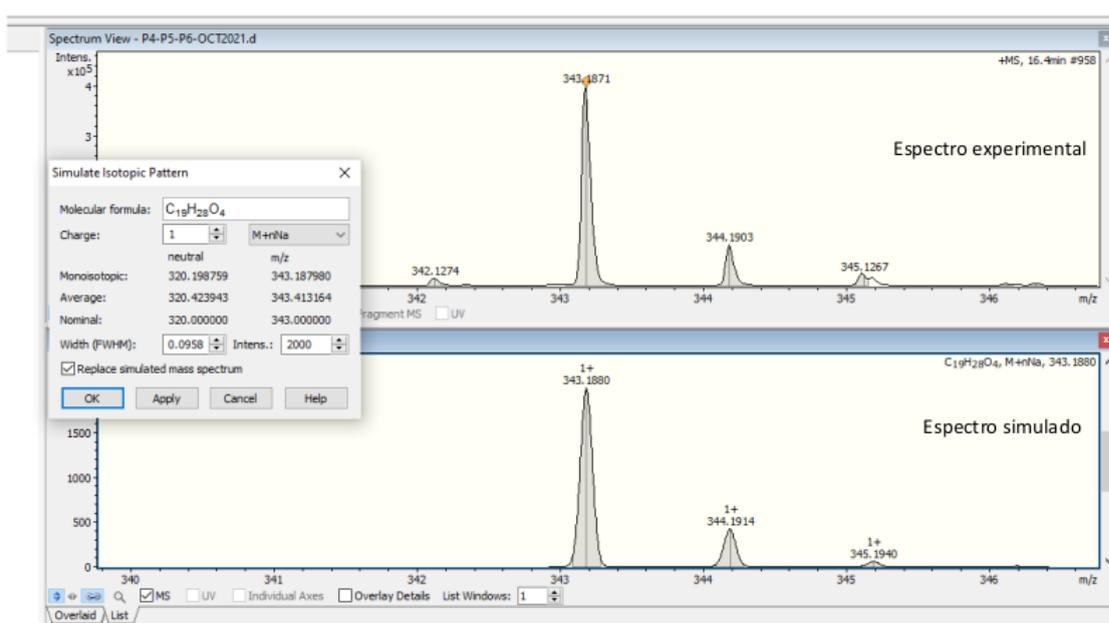


Figura A3.20. HRMS compuesto 3i.