

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **N<sup>o</sup>-arilsulfonil histaminas como potentes y selectivos inhibidores de $\beta$ -glucosidasa**

Osella, María; Ramallo Ayelen\*; Salazar, Mario\*

osella@rosario-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

\*Orientadores

### **Resumen**

N<sup>o</sup>-bencensulfonil histamina, un nuevo inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa semi-sintético, se obtuvo del fraccionamiento bioguiado de un extracto químicamente modificado de *Urtica urens* L. preparado por reacción con cloruro de bencensulfonilo. Este compuesto resultó ser tres veces más activo que N<sup>o</sup>,N<sup>o</sup>-di-bencensulfonil histamina, previamente aislado del mismo extracto. Con el objetivo de identificar mejores inhibidores de  $\beta$ -glucosidasa, se preparó una serie de análogos mono- y di-arilsulfonil derivados de histamina. Los compuestos di-sustituídos se prepararon por reacción entre histamina y una variedad de cloruros de arilsulfonilo; mientras que los derivados mono-sustituídos fueron generados por desprotección selectiva de los correspondientes di-arilsulfonil derivados. Estudios biológicos revelaron inhibición de  $\beta$ -glucosidasa por parte de los N<sup>o</sup>-arilsulfonil derivados con IC<sub>50</sub> en el rango micromolar en el orden del inhibido de referencia, siendo N<sup>o</sup>-4fluorobencensulfonil histamina el más potente. Sumado a esto, este inhibidor, reversible y competitivo, presentó una buena selectividad de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa con respecto a otras enzimas, incluidas  $\alpha$ -glucosidasa.

**Palabras clave:** sulfonilación, extractos vegetales,  $\beta$ -glucosidasa, inhibición.

### **Introducción**

Los compuestos organosulfurados tienen un impacto medicinal extraordinario, aproximadamente el 25% del top200 de las drogas prescritas en EEUU contienen este heteroátomo (Ilardi, Vitaku, & Njardarson, 2014). Sulfonamidas, tioéteres, sulfonas y penicilinas, son las

formas más comunes en las que aparece el azufre en medicamentos, todas ellas bien estudiadas en cuanto a síntesis y aplicaciones durante las últimas décadas (Feng, Tang, Liang, & Jiang, 2016). A pesar de que algunas de estos fármacos tienen un origen natural, en realidad, el contenido de azufre en fármacos es

significativamente mayor que en productos naturales (PNs) (Henkel, Brunne, Müller, & Reichel, 1999). Si se tiene en cuenta que los PNs derivan de un largo proceso evolutivo y que esto resulta en una variedad única de esqueletos con alta afinidad por biomoléculas (posibles *targets* de enfermedades) (Ertl, Roggo, & Schuffenhauer, 2008; G. Li & Lou, 2017) la introducción de átomos de azufre en PNs resulta atractiva. La diversificación de extractos (extractos vegetales químicamente modificados) (EQM) es la estrategia adecuada para lograr esto; según esta metodología, mezclas naturales son alteradas químicamente a través de reacciones dirigidas a la incorporación de funcionalidades o átomos relevantes en la terapia farmacológica, pero de baja ocurrencia en metabolitos secundarios (Ramallo, Salazar, Mendez, & Furlan, 2011). La diversificación de extractos se está transformando en una nueva fuente de moléculas bioactivas semisintéticas, inspiradas en los esqueletos de PNs (García, Ramallo, Salazar, & Furlan, 2016; Giri et al., 2017; Tomohara et al., 2017; Wu et al., 2015). Dentro de este marco, (Salazar, Ramallo, Micheloni, Sierra, & Furlan, 2009) desarrollaron una derivatización directa empleando cloruros de arilsulfonilo sobre extractos vegetales. Así, los hidroxilos y las aminas presentes en las moléculas vegetales de los extractos, sirvieron de

punto de ingreso de los cloruros de sulfonilo, generándose sulfonilesteres y sulfonilamidas. El éxito de la alteración de las propiedades biomoleculares de los extractos modificados con cloruros de sulfonilo, fue reportada, especialmente contra  $\beta$ -glucosidasa. Esta enzima, cataliza la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  en polisacáridos y oligosacáridos y la ruptura de los enlaces  $\beta$  entre azúcares y agliconas. Los compuestos que la inhiben son de gran interés (Lillelund, Jensen, Liang, & Bols, 2002) por su potencial para el tratamiento de infecciones virales (Robina, Moreno-Vargas, Carmona, & Vogel, 2004; Wen, Lin, & Ma, 2003), enfermedades lisosomales hereditarias (Naoki Asano et al., 1995), tumores en general y síndrome de Gaucher (Borges de Melo, da Silveira Gomes, & Carvalho, 2006; Castilla et al., 2012). Como reportara (Salazar, Micheloni, Escalante, & Furlan, 2011), *N,N*-di-bencensulfonil histamina (**II-a**) fue identificado como uno de los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de  $\beta$ -glucosidasa observada en el extracto de *Urtica urens* L. (Urticaceae) modificado con cloruro de bencensulfonil histamina (UU.EQM). En este trabajo se reporta la identificación de un nuevo inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa semi-sintético (**I-a**) aislado del mismo extracto modificado y la síntesis de una pequeña biblioteca de análogos, a los cuales también se les

evaluó su potencial inhibidor enzimático y su selectividad  $\alpha/\beta$ -glucosidasa.

### Objetivos

Purificar e identificar un segundo compuesto activo presente en el extracto modificado de *U. urens*.

Preparar una biblioteca de análogos y evaluar sus propiedades inhibitorias frente a  $\beta$ -glucosidasa.

Comparar la inhibición de  $\beta$ -glucosidasa con la inhibición frente a otra hidrolasa (acetilcolina esterasa) y dos oxidasas (tirosinasa y xantina oxidasa).

Evaluar la selectividad  $\alpha/\beta$ -glucosidasa.

### Materiales y Métodos

Los reactivos químicos y enzimas fueron obtenidos de diferentes fuentes comerciales y fueron utilizados sin purificación extra. Los solventes utilizados presentaban grado de pureza analítica con excepción de algunos, comprados a granel y purificados por procedimientos estándares.

Purificación del compuesto **I-a** del UU.EQM: la fracción diclorometánica (5,52 g, 20,7%) del extracto crudo modificado fue sometida a cromatografía en columna con solventes y mezclas de solventes de polaridad creciente, comenzando con hexano:acetato de etilo (AcOEt) (desde 10:0 hasta 0:10) y continuando con DCM:Metanol (MeOH) (desde 10:0 hasta 8:2). Las 28 fracciones colectadas, fueron

evaluadas por autografía para  $\beta$ -glucosidasa según el método de (Salazar & Furlan, 2007). Las fracciones activas se agruparon en tres, denominadas: 1 (565,6 mg, 10,9%), 2 (108,9 mg, 2,1%) y 3 (541,4 mg, 10,4%). La fracción 3 fue sometida a cromatografía en columna de Sephadex® utilizando como solvente de elución, una mezcla de cloroformo:hexano:MeOH (1:1:2). Las fracciones 3a (58,3 mg, 10,8%), 3b (81,8 mg, 15,1%) y 3c (331,1 mg, 61,2%) presentaron actividad inhibitoria. La fracción 3b, fue purificada por cromatografía en capa delgada de sílica gel en escala preparativa utilizando una mezcla de DCM:MeOH (90:10), a partir de lo cual se generaron siete fracciones, las fracciones 3b1 (12,9 mg, 15,8%), 3b2 (10,4 mg, 12,7%) y 3b3 (7,5 mg, 9,2%) presentaron actividad inhibitoria de  $\beta$ -glucosidasa por autografía.

Procedimiento general para la obtención de derivados *N*<sup>o</sup>,*N*<sup>o</sup>-di-arilsulfonil histamina: una solución de Histamina (0.5 mmol), cloruro de arilsulfonilo (1.0 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.4 mmol) en acetona, se agitó a reflujo por 24 hs. El solvente fue eliminado por evaporación a presión reducida y el residuo resultante fue cromatografiado en columna de sílica gel para obtener puros los compuestos de tipo II.

Procedimiento general para la obtención de derivados *N*<sup>o</sup>-arilsulfonil hitamina: una solución del correspondiente *N*<sup>o</sup>,*N*<sup>o</sup>-di-arilsulfonil histamina (1 mmol) y

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mmol) en etanol:agua (1:1) se agitó a reflujo durante 2 h. El solvente fue eliminado a presión reducida y el residuo fue cromatografiado en columna de sílica gel para obtener puros, los derivados de tipo I.

Las estructuras de todos los compuestos fueron verificadas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa. Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN fueron obtenidos en un equipo Bruker *advance* II a 300 MHz en CDCl<sub>3</sub>, DC<sub>3</sub>OD o acetona-d<sub>6</sub>, en presencia de TMS (0.00 ppm) como estándar interno. Espectros de <sup>13</sup>C-RMN fueron obtenidos en el mismo aparato a 75 MHz, con los mismos solventes y estándar interno; Las asignaciones de <sup>13</sup>C se realizaron en base a desplazamientos químicos y multiplicidad de protones (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC y HMBC).

Los espectros de masa de alta resolución fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker mocrOTOF- II (Bruker-Daltonics). Las muestras fueron preparadas en acetonitrilo adquirido en Carlo Erba. Parámetros MS y MS-MS: tipo de fuente: ESI; polaridad del ion: positiva; nebulizador: 0.4 Bar; corriente de calor: 180°C; corriente de gas: 4.0 L/min; capilar: 4500V; fin del placa: 500 V; frecuencia de radio de la celda: 150.0 Vpp; energía de colisión ISC para experimentos MS-MS: 30 eV.

Ensayo autográfico de β-glucosidasa. Solución reveladora: Agar (52.5 mg) se

disolvió a 80 °C en buffer de acetato de sodio (0.1 M, pH 5, 7.5 mL). Enfriado a 60°C, se agregó una solución de FeCl<sub>3</sub> (0.5% p/v en 0.1 M buffer acetato, 0.9 mL). Luego de mezclar por inversión y alcanzados los 40°C, se agregó una solución de β-glucosidasa en el mismo buffer (2.5 U/mL, 25 μL). Procedimiento típico de revelado: 6.5 mL de la solución reveladora, se distribuyen aún tibia sobre la placa cromatográfica (CCD) sembrada (10×5 cm). Una vez solidificado el agar, la placa se incubaba a 37°C por 120 min. Seguidamente se sumerge en una solución de esculina al 0.2 % p/v en el mismo buffer y así sumergida se vuelve a incubar durante 120 min a 37°C. Los halos claros observados en contraste con el fondo marrón, representan áreas de inhibición de β-glucosidasa.

Ensayos en microplaca. β-glucosidasa: Se siguió el método de (Arnaldos, Serrano, Calderón, & Muñoz, 1999) con algunas modificaciones. Los pocillos se llenaron por triplicado con β-glucosidasa (almendras) en buffer fosfato (0.1 M, pH 7, 7.10 μU/mL concentración final), α-ciclodextrina en el mismo buffer (1.22 mM concentración final) y 10 μL del compuesto a testear, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Pocillos sin inhibidor y con el correspondiente volumen de DMSO fueron usados como control negativo, mientras que 1-deoxinojirimicina (1-DNJ) en DMSO se usó como control de inhibición positiva. La reacción se inició por

adición de *p*-nitrofenol  $\beta$ -O-D-glucopyranosido ( $\beta$ -PNPG) y luego de agitar dos segundos, su hidrólisis fue medida durante 10 minutos por el incremento en la absorbancia a 405 nm. Volumen final en pocillo: 270  $\mu$ L. Para la determinación de IC<sub>50</sub>, se prepararon 10 diluciones seriadas de cada compuesto en DMSO, comenzando en 0.6  $\mu$ M y siguiendo una escala logarítmica neperiana.

**Tirosinasa:** se usó el método de (Atta-ur-Rahman, Choudhary, & Thomsen, 2001). Los pocillos se llenaron por triplicado con 10  $\mu$ L del compuesto a testear, en DMSO y tirosinasa (hongos) en buffer fosfato (0.1 M, pH 7, concentración final 15.55 U/mL). Pocillos con el correspondiente volumen de DMSO, sin compuesto, se usaron como control negativo, mientras que pocillos con ácido kójico en DMSO se usaron como control de inhibición positiva. La reacción se inició con el agregado de tirosina (0.63 mM concentración final en pocillo). Luego de mezclar dos segundos, la formación de DOPAcromo se monitoreó durante 30 min a 37°C por el incremento de la absorbancia a 475 nm. Volumen final en pocillo: 270  $\mu$ L.

**Xantina oxidasa:** Siguiendo el método reportado por (Chu, Chen, Wu, & Hsieh, 2014), los pocillos se llenaron por triplicado con 10  $\mu$ L del compuesto a testear, en DMSO y xantina oxidasa (bovina) en buffer fosfato (0.2 M, pH 7.5, 2.81  $\mu$ U/mL concentración final en pocillo). Pocillos con

el correspondiente volumen de DMSO, sin compuesto, se usaron como control negativo, mientras que pocillos con allopurinol en DMSO se usaron como control de inhibición positiva. La reacción se inició con el agregado de xantina en el mismo buffer (40  $\mu$ M concentración final en pocillo). Luego de mezclar dos segundos, la formación de ácido úrico se monitoreó durante 20 min a 30°C por el incremento de la absorbancia a 295 nm. Volumen final en pocillo: 270  $\mu$ L.

**Acetil colinesterasa:** Se siguió el método de (Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961) con algunas modificaciones. Los pocillos se llenaron por triplicado con acetil colinesterasa (anguila eléctrica) en buffer fosfato (0.1 M, pH 7.5, 13.7  $\mu$ U/mL concentración final), reactivo de Ellman (DTNB) en el mismo buffer (0.31 mM concentración final) y 10  $\mu$ L del compuesto a testear, disuelto en DMSO. Pocillos sin inhibidor y con el correspondiente volumen de DMSO fueron usados como control negativo, mientras que eserina en DMSO se usó como control de inhibición positiva. La reacción se inició por adición de ioduro de acetil tiocolina y luego de agitar dos segundos, su hidrólisis fue medida durante 15 min por el incremento en la absorbancia a 405 nm. Volumen final en pocillo: 270  $\mu$ L.

$\alpha$ -glucosidasa: similarmente al ensayo de  $\beta$ -glucosidasa, los pocillos se llenaron por triplicado con  $\alpha$ -glucosidasa (levaduras) en

buffer fosfato (0.1 M, pH 7, 7.10  $\mu$ U/mL concentración final),  $\alpha$ -ciclodextrina en el mismo buffer (1.22 mM concentración final) y 10  $\mu$ L del compuesto a testear, disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Pocillos sin inhibidor y con el correspondiente volumen de DMSO fueron usados como control negativo, mientras que 1-deoxinojirimicina (1-DNJ) en DMSO se usó como control de inhibición positiva. La reacción se inició por adición de  $\alpha$ -PNPG y luego de agitar dos segundos, su hidrólisis fue medida durante 10 minutos por el incremento en la absorbancia a 405 nm. Volumen final en pocillo: 270  $\mu$ L.

Todos los datos fueron procesados con el programa Prism V5.01 (GraphPad Software Inc., la Jolla, CA USA).

Ensayo de reversibilidad de la unión enzima-inhibidor: una solución en DMSO del compuesto **I-c**, se incubó a una concentración de 10 veces su  $IC_{50}$  para  $\beta$ -glucosidasa, con  $\beta$ -glucosidasa en buffer fosfato, a una concentración igual a 100 veces usada para los ensayos de  $IC_{50}$ . Luego de 30 min, la mezcla se diluyó 100 veces en buffer, se agregó  $\alpha$ -ciclodextrina y el sustrato para comenzar la reacción. La curva de progreso de esta muestra fue medida y comparada con una muestra de enzima incubada y diluida en las mismas condiciones con DMSO en ausencia de **I-c**. Cada incubación y dilución fueron repetidas por triplicado. El tratamiento de datos y porcentaje de recuperación de la

actividad enzimática se obtuvo usando Prism V5.01.

Experimentos cinéticos: El ensayo se llevó a cabo variando la concentración de sustrato entre 0.022 y 7.2 mM, así como la concentración de **I-c** entre 0.0061 y 0.239. Las curvas de velocidad inicial vs concentración de sustrato fueron obtenidas del ajuste de los datos para la ecuación de Michaelis y Menten.

## Resultados y Discusión

Las propiedades inhibitorias de  $\beta$ -glucosidasa del UU.EQM y del respectivo extracto sin modificar se evaluaron por autorgrafía. Se observaron dos áreas de inhibición en la calle correspondiente al UU.EQM, las cuales estaban ausentes en el extracto nativo, por lo que probablemente se tratara de compuestos generados en la reacción. El halo inhibitorio con mayor  $R_f$  era producido por  $N^{\alpha},N^{\alpha}$ -di-arilsulfonyl histamina **II-a**, previamente aislado del mismo extracto (fig. 1, calle 1,  $R_f$  0.75). Para identificar al compuesto responsable del segundo halo inhibitorio (fig. 1, calle 1,  $R_f$  0.25), UU.EQM fue sometido a cromatografía bioguiada.

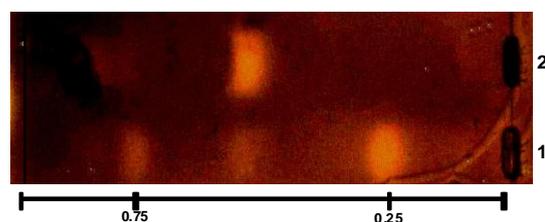


Fig. 1: autorgrafía de  $\beta$ -glucosidasa. Calle 1: UU.EQM, calle 2: Extracto sin modificar. CCD eluida con DCM:MeOH (9:1).

Los análisis por espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) de la fracción purificada, evidenciaron una señal de  $m/z = 252.08012$  correspondiente con una fórmula molecular  $C_{11}H_{14}N_3O_2S$ . Los análisis de experimentos MS-MS mostraron fragmentos característicos del radical bencensulfonilo ( $m/z = 141$ ) sugiriendo que el compuesto activo podría ser *N*<sup>ε</sup>-bencensulfonil histamina **I-a**. Para confirmar la estructura propuesta, **I-a** fue preparado a partir de **II-a** por desprotección selectiva del *N*<sup>ε</sup> en MeOH:H<sub>2</sub>O. El espectro de <sup>1</sup>H-RMN, el patrón isotópico de los espectros de HRMS y los perfiles de los experimentos de MS-MS del producto principal obtenido, corroboraron la estructura de **I-a**.

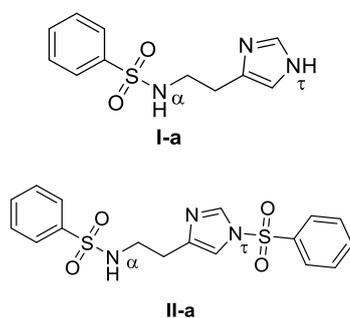


Fig 2. Inhibidores de  $\beta$ -glucosidasa aislados en el UU.EQM.

Sumado a eso, los perfiles autográficos de **I-a** y de la fracción purificada del UU.EQM fueron coincidentes.

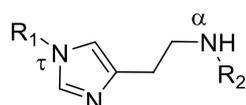
La  $IC_{50}$  medida de **I-a** fue de 197.2  $\mu$ M, dos veces más baja que la reportada para **II-a** ( $IC_{50}$  250.0  $\mu$ M) (Salazar et al., 2011). Es sabido que los anillos de imidazol se unen al sitio activo de la enzima con una  $K_i$  de 0.53 mM; por su parte, la histamina, es un

inhibidor mucho más débil  $K_i$  2.10 mM (Field, Haines, Chrystal, & Luszniak, 1991). De todas formas la presencia de bencilos en su grupo amino, incrementa la capacidad inhibitoria, sugiriendo que éste podría interactuar con algún bolsillo hidrofóbico de la enzima (Lillelund et al., 2002). Más aún, se ha observado que el anillo aromático ubicado a 4 ó 5 enlaces del imidazol, producía los mejores efectos (Y. K. Li, Hsu, Chang, & Chen, 1998) y esto concuerda con las estructuras de **I-a** y **II-a**. Con el objetivo de explorar el potencial de los derivados sulfonilados de histamina, se preparó una serie de análogos mono- y di- sustituidos, por reacción entre histamina y diversos cloruros de arilsulfonilo. Como el enfoque principal de la modificación química de extractos es complementar la maquinaria biosintética de la naturaleza incorporando elementos poco frecuentes en ella y altamente frecuente en drogas, seleccionamos reactivos fluorados. Los compuestos organofluorados están prácticamente ausentes en plantas, representando solo un 1% de todos los organohalogenados de ocurrencia natural (Deng, O'Hagan, & Schaffrath, 2004). La incorporación de flúor en una molécula puede modificar sus propiedades fisicoquímicas y su estabilidad metabólica substancialmente (Purser, Moore, Swallow, & Gouverneur, 2008). El uso estratégico de flúor en el diseño de drogas ha conducido a medicamentos claves

disponibles en el mercado; por lo que no es extraño que alrededor de un 25% de las drogas que actualmente se encuentran en fase clínica, posean al menos, un átomo de flúor (Swallow, 2015).

En todos los casos el derivado *N*<sup>α</sup>,*N*<sup>τ</sup>-di-arilsulfonilado (compuestos tipo II, tabla 1) se obtuvo como producto principal con rendimientos de entre 48 y 81%. Los derivados *N*<sup>α</sup>-arilsulfonilados (compuestos de tipo I, tabla 1), por su parte se obtuvieron en rendimientos casi cuantitativos por desprotección del correspondiente tipo II.

Tabla 1: colección de derivados mono- (tipo I) y di- (tipo II) arilsulfonilados de histamina.



Tipo I $R_1=H, R_2=$	Tipo II $R_1=R_2=$

La inhibición de  $\beta$ -glucosidasa, fue inicialmente ensayada a una concentración fija de 40  $\mu$ M. Esta concentración es

aproximadamente la mitad de la  $IC_{50}$  reportada para 1-DNJ, inhibidor de referencia de  $\beta$ -glucosidasa (81.0  $\mu$ M) (Evans, Fellows, Shing, & Fleet, 1985). Todos los derivados de tipo I mostraron una inhibición superior al 25%, con excepción de **I-e** (fig. 3). Por el contrario, la mayoría de los derivados de tipo II no produjeron una inhibición significativa. De acuerdo con estos resultados, la presencia de un grupo arilo en el anillo imidazol, disminuye la potencia inhibitoria, lo cual podría estar relacionado a la necesidad de un H disponible en la posición  $R_1$ , presumiblemente participante de un enlace puente hidrógeno clave en la interacción con la enzima (Y. K. Li et al., 1998).

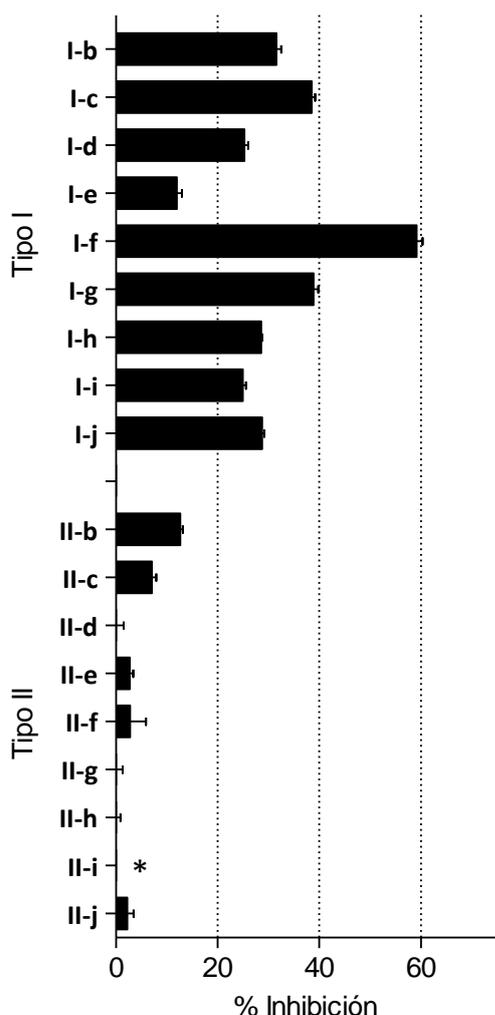


Fig. 3: Screening biológico de los derivados de histamina tipo I y II. % de inhibición de  $\beta$ -glucosidasa a 40  $\mu$ M. \* Medida no considerada debido a la turbidez del pocillo.

Los compuestos de tipo I se estudiaron en mayor profundidad. De todos ellos, **I-c**, **I-d**, **I-g** y **I-h**, mostraron una potencia inhibitoria similar a la medida para 1-DNJ (tabla 2).

Tabla 2: Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu$ M) para los derivados tipo I. 1-DNJ, inhibidor de referencia.

Derivados tipo I	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
<b>I-b</b>	250.00 $\pm$ 1.03
<b>I-c</b>	65.08 $\pm$ 1.04
<b>I-d</b>	79.50 $\pm$ 1.05
<b>I-e</b>	421.6 $\pm$ 0.94

<b>I-f</b>	244.2 $\pm$ 1.09
<b>I-g</b>	71.43 $\pm$ 1.02
<b>I-h</b>	72.69 $\pm$ 1.05
<b>I-i</b>	102.20 $\pm$ 1.05
<b>I-j</b>	95.55 $\pm$ 1.02
1-DNJ	65.18 $\pm$ 1.04

Las diferencias de inhibición observada estarían relacionadas con el patrón de sustitución aromático. El compuesto *p*-flúor-sustituido (**I-c**) mostró el mejor efecto. La sustitución en esta posición ya había sido estudiada por (Y. K. Li et al., 1998) para compuestos, *N*-acil histaminas. En su caso, habiendo probado sustituyentes como N, CN, OCH<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub>, habían llegado a la conclusión de que el simple anillo aromático (H en 4), era el compuesto más activo. En nuestro caso, el átomo de flúor, más pequeño, reemplazando al átomo de hidrógeno, mejoró el efecto inhibitorio (**I-c** con respecto a **I-a**). Un aumento similar de la potencia se observó cuando el CH<sub>3</sub> de **I-b**, fue reemplazado por un grupo CF<sub>3</sub> en **I-d**. Variantes de la sustitución aromática respecto de **I-c**, causaron una influencia irrelevante en la capacidad inhibitoria. El incremento de la cantidad de flúor en el anillo, generó compuestos de potencia similar (**I-g** y **I-h**) o menor (**I-e**) a **I-c**; mientras que una disminución del efecto inhibitorio se observó con el flúor en posición *meta* (**I-j**) y fue más marcada aún con la sustitución en *orto* (**I-e**).

Se usó al compuesto **I-c**, para continuar con la caracterización de esta serie. El ensayo de reversibilidad arrojó un porcentaje de recuperación de la actividad enzimática del 91%, lo cual indica que la interacción enzima-inhibidor es reversible (fig. 4).

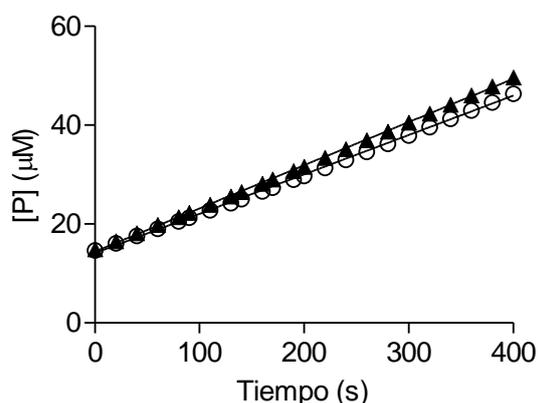


Fig. 4: Ensayo de reversibilidad. Curva de control (triángulos) y **I-c** (círculos).

Por otro lado de los experimentos cinéticos deducimos que se trata de un inhibidor de tipo competitivo (fig. 5) y que se une a la enzima con una  $K_i$  de  $8.1 \mu\text{M}$ , casi seis veces más baja que la  $K_i$  de 1-DNJ ( $47.0 \mu\text{M}$ ) medida en condiciones similares (Bols, Hazell, & Thomsen, 1997).

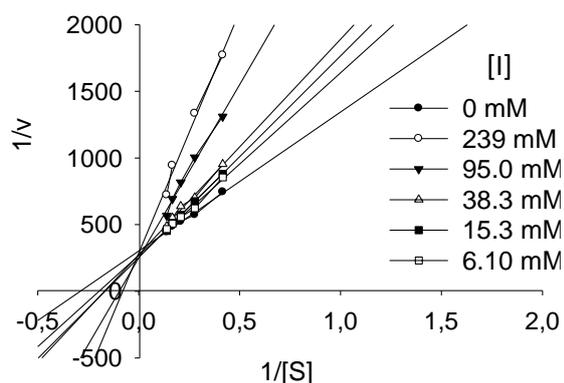


Fig. 5: Gráfico de Lineweaver-Burk. Inhibición de  $\beta$ -glucosidasa a distintas concentraciones de de  $p$ -NPG y de **I-c**

Además, la actividad de **I-c** fue determinada para dos oxidasas (Xantina oxidasa y tirosinasa) ( $XO$  y  $Tyr_{ase}$ ) y para otra hidrolasa (acetil colinesterasa) (fig.6)

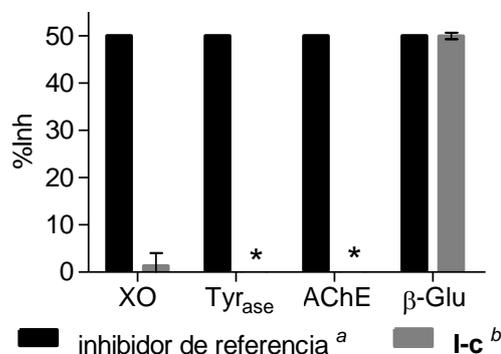


Fig 6: comparación de la potencia inhibitoria de **I-c** vs el inhibidor de referencia para cada enzima. <sup>a</sup>alopurinol para  $XO$  ( $IC_{50}$   $2.52 \mu\text{M}$ ), ácido kójico para  $Tyr_{ase}$  ( $IC_{50}$   $40.00 \mu\text{M}$ ), eserina para  $AChE$  ( $IC_{50}$   $1.17 \mu\text{M}$ ) y 1-DNJ para  $\beta$ -Glu ( $IC_{50}$   $65.18 \mu\text{M}$ ). <sup>b</sup>**I-c** a  $3 \mu\text{M}$  en el ensayo de  $XO$ , a  $40 \mu\text{M}$  en el ensayo de  $Tyr_{ase}$ , a  $1.5 \mu\text{M}$  en el de  $AChE$  y a  $65 \mu\text{M}$  en  $\beta$ -Glu. \*No se observó inhibición de  $Tyr_{ase}$  o  $AChE$  por parte de **I-c**. En todos los casos **I-c** fue testeado en concentraciones similares a la  $IC_{50}$  reportada para su inhibidor de referencia. Mientras que  $\beta$ -glucosidasa fue inhibida en un 49.94%, no se detectó inhibición alguna de  $Tyr_{ase}$  o  $AChE$  y solo se observó un 1.34% de inhibición de  $XO$ . Esto conduce a la idea de una habilidad de reconocimiento de *targets* específicos por parte de este tipo de compuestos, lo cual es importante desde el punto de vista de los posibles efectos adversos causados por la inhibición simultánea de numerosas enzimas. Aún más, cuando **I-c** fue evaluado como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa, el valor encontrado de  $IC_{50}$  resultó ser mucho más alto que la  $IC_{50}$  para  $\beta$  ( $3651.0$  vs  $65.0 \mu\text{M}$ ).

Esto significa que **I-c** es 56 veces mejor inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa que de  $\alpha$ -glucosidasa mientras que 1-DNJ es solamente 5 veces mejor inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa que de  $\alpha$ -glucosidasa (333.0 vs 65.1  $\mu$ M). A pesar de que estas dos glucosidasas representan una pequeña porción de una gran familia de enzimas, reportar esta selectividad y potencia mejoradas es un punto de partida para considerar a los derivados mono-aril sulfonil histamina como candidatos válidos para nuevos estudios. Los problemas de selectividad detectados en estadios avanzados del desarrollo de drogas han llevado a numerosas decepciones en la clínica (Horne, Wilson, Tinsley, Williams, & Storer, 2011).

### Conclusiones

La diversificación de extractos vegetales nos condujo a un nuevo derivado sulfonilado de histamina como prometedora inhibidor de  $\beta$ -glucosidasa. Este es el tercer compuesto bioactivo generado en MQE por sulfonilación, y ha inspirado a la creación de una biblioteca de 18 análogos, en su mayoría fluorados. En general los derivados  $N^R$ -arilsulfonilados presentaron mejores propiedades como inhibidores de  $\beta$ -glucosidasa; cuatro de ellos **I-c**, **I-d**, **I-g** y **I-h** mostraron potencias similares al inhibidor de referencia 1-DNJ y tres de ellos poseen al menos un átomo de flúor en posición *para* del anillo aromático. Los

estudios enzimáticos, basados en **I-c**, revelan inhibición reversible y competitiva con una  $K_i$  6 veces menor que la  $K_i$  de 1-DNJ al mismo tiempo que una interesante selectividad de inhibición  $\alpha/\beta$ . Así los derivados  $N^R$ -arilsulfonilados de histamina, representan una expansión del espacio químico de inhibidores de glucosidasas, optimizando al mismo tiempo potencia y selectividad.

### Bibliografía

- Arnaldos, T. L., Serrano, M. L., Calderón, A. A., & Muñoz, R. (1999). A rapid and continuous spectrophotometric method to measure b-glucosidase activity based on p-nitrophenylb-O-D-glucopyranoside hydrolysis. *Phytochemical Analysis*, 10(4), 171-174.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199907/08\)10:4<171::AID-PCA452>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199907/08)10:4<171::AID-PCA452>3.0.CO;2-4)
- Asano, Naoki, Kizu, H., Oseki, K., Tomioka, E., Matsui, K., Okamoto, M., & Baba, M. (1995). N-Alkylated Nitrogen-in-the-Ring Sugars: Conformational Basis of Inhibition of Glycosidases and HIV-1 Replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(13), 2349-2356.  
<https://doi.org/10.1021/jm00013a012>
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M. I., & Thomsen, W. J. (2001). *Bioassay*

- techniques for drug development*. Amsterdam: Harwood Acad. Publ.
- Bols, M., Hazell, R. G., & Thomsen, I. B. (1997). 1-Azafagomine: A Hydroxyhexahydropyridazine That Potently Inhibits Enzymatic Glycoside Cleavage. *Chemistry - A European Journal*, 3(6), 940-947. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030616>
- Borges de Melo, E., da Silveira Gomes, A., & Carvalho, I. (2006).  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, 62(44), 10277-10302. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.08.055>
- Castilla, J., Rísquez, R., Cruz, D., Higaki, K., Nanba, E., Ohno, K., ... Castellón, S. (2012). Conformationally-Locked *N*-Glycosides with Selective  $\beta$ -Glucosidase Inhibitory Activity: Identification of a New Non-Iminosugar-Type Pharmacological Chaperone for Gaucher Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(15), 6857-6865. <https://doi.org/10.1021/jm3006178>
- Chu, Y.-H., Chen, C.-J., Wu, S.-H., & Hsieh, J.-F. (2014). Inhibition of Xanthine Oxidase by *Rhodiola crenulata* Extracts and Their Phytochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3742-3749. <https://doi.org/10.1021/jf5004094>
- Deng, H., O'Hagan, D., & Schaffrath, C. (2004). Fluorometabolite biosynthesis and the fluorinase from *Streptomyces cattleya*. *Natural Product Reports*, 21(6), 773. <https://doi.org/10.1039/b415087m>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ertl, P., Roggo, S., & Schuffenhauer, A. (2008). Natural Product-likeness Score and Its Application for Prioritization of Compound Libraries. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48(1), 68-74. <https://doi.org/10.1021/ci700286x>
- Evans, S. V., Fellows, L. E., Shing, T. K. M., & Fleet, G. W. J. (1985). Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues of monosaccharides. *Phytochemistry*, 24(9), 1953-1955. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83099-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83099-X)
- Feng, M., Tang, B., Liang, S. H., & Jiang, X. (2016). Sulfur Containing

- Scaffolds in Drugs: Synthesis and Application in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(11), 1200-1216.
- Field, R. A., Haines, A. H., Chrystal, E. J. T., & Luszniak, M. C. (1991). Histidines, histamines and imidazoles as glycosidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 274(3), 885-889.
- García, P., Ramallo, I. A., Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2016). Chemical diversification of essential oils, evaluation of complex mixtures and identification of a xanthine oxidase inhibitor. *RSC Advances*, 6(62), 57245-57252.  
<https://doi.org/10.1039/C6RA05373D>
- Giri, G. F., Viarengo, G., Furlán, R. L. E., Suárez, A. G., Garcia Vescovi, E., & Spanevello, R. A. (2017). Soybean hulls, an alternative source of bioactive compounds: Combining pyrolysis with bioguided fractionation. *Industrial Crops and Products*, 105, 113-123.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.005>
- Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H., & Reichel, F. (1999). Statistical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(5), 643-647.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990301\)38:5<643::AID-ANIE643>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990301)38:5<643::AID-ANIE643>3.0.CO;2-G)
- Horne, G., Wilson, F. X., Tinsley, J., Williams, D. H., & Storer, R. (2011). Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow. *Drug Discovery Today*, 16(3-4), 107-118.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.017>
- Ilardi, E. A., Vitaku, E., & Njardarson, J. T. (2014). Data-Mining for Sulfur and Fluorine: An Evaluation of Pharmaceuticals To Reveal Opportunities for Drug Design and Discovery: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(7), 2832-2842.  
<https://doi.org/10.1021/jm401375q>
- Li, G., & Lou, H.-X. (2017). Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Medicinal Research Reviews*.  
<https://doi.org/10.1002/med.21474>
- Li, Y. K., Hsu, H. S., Chang, L. F., & Chen, G. (1998). New imidazoles as probes of the active site topology and potent inhibitors of beta-glucosidase. *Journal of Biochemistry*, 123(3), 416-422.
- Lillelund, V. H., Jensen, H. H., Liang, X., & Bols, M. (2002). Recent

- Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin. *Chemical Reviews*, 102(2), 515-554.  
<https://doi.org/10.1021/cr000433k>
- Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S., & Gouverneur, V. (2008). Fluorine in medicinal chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 37(2), 320-330.  
<https://doi.org/10.1039/B610213C>
- Ramallo, I. A., Salazar, M. O., Mendez, L., & Furlan, R. L. E. (2011). Chemically Engineered Extracts: Source of Bioactive Compounds. *Accounts of Chemical Research*, 44(4), 241-250.  
<https://doi.org/10.1021/ar100106n>
- Robina, I., Moreno-Vargas, A., Carmona, A., & Vogel, P. (2004). Glycosidase Inhibitors as Potential HIV Entry Inhibitors? *Current Drug Metabolism*, 5(4), 329-361.  
<https://doi.org/10.2174/1389200043335513>
- Salazar, M. O., & Furlan, R. L. E. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 18(3), 209-212.  
<https://doi.org/10.1002/pca.971>
- Salazar, M. O., Micheloni, O., Escalante, A. M., & Furlan, R. L. E. (2011). Discovery of a  $\beta$ -glucosidase inhibitor from a chemically engineered extract prepared through sulfonylation. *Molecular Diversity*, 15(3), 713-719.  
<https://doi.org/10.1007/s11030-010-9301-2>
- Salazar, M. O., Ramallo, I. A., Micheloni, O., Sierra, M. G., & Furlan, R. L. E. (2009). Chemically engineered extracts: Bioactivity alteration through sulfonylation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(17), 5067-5070.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.038>
- Swallow, S. (2015). Fluorine in Medicinal Chemistry. En *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 54, pp. 65-133). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.11.001>
- Tomohara, K., Ito, T., Furusawa, K., Hasegawa, N., Tsuge, K., Kato, A., & Adachi, I. (2017). Multiple production of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acid derivatives through direct chemical derivatization of natural plant extracts: An apparently difficult but successful route. *Tetrahedron Letters*, 58(32), 3143-3147.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.06.087>
- Wagman, A. S., & Nuss, J. M. (2001). Current therapies and emerging targets for the treatment of

diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 7(6), 417-450.

Wen, Y.-M., Lin, X., & Ma, Z.-M. (2003). Exploiting new potential targets for anti-hepatitis B virus drugs. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, 3(3), 241-246.

Wu, T., Jiang, C., Wang, L., Morris-Natschke, S. L., Miao, H., Gu, L., ... Gu, Q. (2015). 3,5-Diarylpyrazole Derivatives Obtained by Ammonolysis of the Total Flavonoids from *Chrysanthemum indicum* Extract Show Potential for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Natural Products*, 78(7), 1593-1599. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00156>