

# Síntesis, estudio teórico de aril-lactonas y evaluación de su actividad inhibidora de la formación de $\beta$ -hematina y de la enzima $\beta$ -lactamasa

Consuelo Jaramillo Florez, Cristina Mora, Luís Esteban Vélez P. y Jairo Quijano T.\*

Laboratorio de Investigación en Sustancias Bioactivas, Torre 2-229, SIU, Universidad de Antioquia, AA 1226 Medellín, Colombia. Correo electrónico: consuelo.jaramillo@gmail.com \*Grupo de Físico Química Orgánica, Universidad Nacional, sede Medellín, Colombia. Correo electrónico: jquijano@unal.edu.co

Recibido: 18 de marzo de 2008. Aceptado: 6 de marzo de 2009.

Palabras clave:  $\beta$ -hematina,  $\beta$ -lactamasa, lactonas, Fe porfirínico, modelación molecular.  
Key words:  $\beta$ -hematin,  $\beta$ -lactamase, lactones, porphyrin Fe, molecular modeling.

**RESUMEN.** Las enfermedades infecciosas se han convertido en un problema de salud pública debido a la emergencia de la resistencia microbiana. Más de cinco millones de personas en Colombia viven en regiones endémicas de malaria cuyo parásito es resistente a cloroquina. Microorganismos como *S. aureus* y *Enterococcus* spp., han desarrollado la enzima  $\beta$ -lactamasa que los hace resistentes a antibióticos. Se sintetizaron cuatro  $\alpha,\gamma$ -aril-lactonas, las cuales fueron evaluadas como inhibidoras de formación de  $\beta$ -hematina a 2 mg/mL. La reacción se realizó a 60 °C por 1 h a pH 4,0 y el complejo fue monitoreado a 386 nm. Las lactonas también fueron evaluadas como inhibidoras de la enzima  $\beta$ -lactamasa, a concentraciones de 5,4  $\mu$ mol/L para los inhibidores y 36 a 108  $\mu$ mol/L para amoxicilina como sustrato. La actividad enzimática de los compuestos se monitoreó a 250 nm, 37 °C por 10 h a pH 7,3. La modelación de los complejos lactona-Fe porfirínico de la hemina mostró que la interacción se establece a través del oxígeno del anillo furano, pero cuando la lactona tiene un grupo  $\alpha$ -piridinil, la interacción se favorece a través del nitrógeno con detrimento de la actividad inhibidora. En la modelación molecular de los complejos enzimáticos se muestra que los residuos del sitio activo responsables de la interacción con la lactona son la Serina64 y Tirocina150 a través de fuertes enlaces de hidrógeno entre los hidroxilos de estos residuos y el oxígeno carbonílico de la lactona.

**ABSTRACT.** Infectious diseases have become a problem of public health due to the resurgence of microbial resistance. More than five millions of people from Colombia live in endemic regions of malaria whose parasite is resistant to chloroquine. Microorganisms like *S. aureus* and *Enterococcus* spp., have developed  $\beta$ -lactamase enzyme which converts them resistant to antibiotics. Four  $\alpha,\gamma$ -aryllactones was synthesized which were evaluated as inhibitors of  $\beta$ -hematin formation at 2 mg/mL. The reaction was performed at 60 °C for 1 h at pH 4.0 and the complex was determined by measuring the absorbance at 386 nm. The lactones were evaluated too as inhibitors of  $\beta$ -lactamase enzyme at 5.4  $\mu$ mol/L and amoxicillin as substrate at 36-108  $\mu$ mol/L. The enzymatic activity of the compounds was carried out at 37 °C for 10 h at pH 7.3 and the enzymatic kinetic was determined by measuring the absorbance at 250 nm. The modeling of the lactone-Fe porphyrin complexes shows the interaction was established through furan ring oxygen, but when the lactone had an  $\alpha$ -pyridinyl group the interaction was improved through the nitrogen with loss of the inhibitory activity. The molecular modeling of the enzyme-complexes shown the active site residues responsible for the interaction with the lactones were Ser64 and Tyr150 through hydrogen bounds between the hydroxyls of this residues and carbonyl oxygen of the lactone.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente existen personas que aún mueren por enfermedades que pueden ser prevenibles, debido a que los patógenos han creado un arsenal de armas propias para establecer y causar serios problemas en el huésped. La resistencia microbiana es un importante problema de salud pública que afecta a la mayoría de los países del mundo. La producción de  $\beta$ -lactamasas es el medio más importante de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y, en la actualidad, hay varias clases de esta enzima de origen bacteriano.<sup>1</sup>

Las características mismas de los microorganismos hacen que la lucha contra ellos se haya convertido en una carrera donde se ha tenido la necesidad de emplear

todo tipo de estrategias, desde las convencionales como la búsqueda de compuestos nuevos con mayor actividad biológica, hasta el diseño de moléculas mediante procedimientos biotecnológicos, pasando por combinaciones de antimicrobianos.<sup>2</sup> Desafortunadamente, para el tratamiento quimioterapéutico y clínico, las  $\beta$ -lactamasas podrían ser consideradas como armas moleculares bacterianas.<sup>3</sup>

En América, más del 38 % de la población vive en zonas endémicas de malaria. El 85 % del territorio colombiano presenta condiciones climáticas aptas para la transmisión de la enfermedad.<sup>4</sup> Tal es el caso de la Costa Atlántica y Pacífica, San Andrés Islas, Los Llanos Orientales, el Amazonas, Orinoquía, Urabá, Bajo Cauca, Mag-

dalena Medio, Norte de Santander, Casanare, Bolívar, Cundinamarca, Caquetá y Tolima.<sup>5-7</sup>

Debido a la resistencia que ha presentado el parásito a la cloroquina, y teniendo en cuenta el modo de acción de este medicamento, el mecanismo de inhibición de la formación de hemozoína permanece como blanco atractivo para el diseño de nuevos fármacos antimaláricos.<sup>5,8</sup>

Un método *in vitro* que predice la actividad antimalárica de compuestos es la evaluación como inhibidores de la formación de  $\beta$ -hematina, un polímero semejante a la hemozoína.<sup>9</sup>

Las lactonas son núcleos ampliamente distribuidos en la Naturaleza y presentan una amplia actividad biológica. Particularmente, algunas  $\gamma$ -lactonas bencil y aril sustituidas han mostrado actividad anticancerígena y antiinflamatoria, o son usadas para sintetizar antibióticos y antitumorales, sin embargo, la síntesis de este núcleo ha recibido poca atención.<sup>10</sup>

Este trabajo tuvo como objetivo contribuir a la búsqueda de alternativas terapéuticas para el control de la resistencia producida por microorganismos como *P. falciparum* y bacterias como *S. aureus*, *E. cloacae*, etc., productoras de  $\beta$ -lactamasa. Con este fin, se realizó la síntesis de cuatro  $\alpha,\gamma$ -aril-lactonas: (1) 5-(4-clorofenil)-3-[4-(dimetilamino)fenil]dihidrofuran-2(3H)-ona, (2) 3,5-difenildihidrofuran-2(3H)-ona, (3) 5-(4-clorofenil)-3-fenildihidrofuran-2(3H)-ona, (4) 5-(4-clorofenil)-3-piridin-4-ildihidrofuran-2(3H)-ona (Fig. 1), que fueron evaluadas como inhibidoras de la formación de  $\beta$ -hematina, un método utilizado para determinar compuestos como potenciales antimaláricos y como inhibidoras de la enzima  $\beta$ -lactamasa, teniendo este blanco como modelo para la búsqueda de inhibidores que permitan aprovechar los antibióticos actuales, que debido a la resistencia se han convertido en ineficaces.<sup>11</sup>

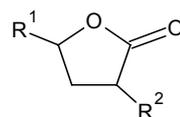
Teniendo en cuenta el modo de acción de la cloroquina que actúa como inhibidora de la formación de hemozoína uniéndose a la hemina libre y evitando el crecimiento del complejo,<sup>12</sup> se evaluó la habilidad de las lactonas para intervenir en la polimerización de la

hemina *in vitro*. Este método requiere 1 h para obtener el complejo lactona-hemina, la formación de  $\beta$ -hematina fue comprobada mediante la medición de la absorbancia a 386 nm.<sup>5,13-14</sup> Las lactonas fueron evaluadas a 2 mg/mL y la cloroquina, como patrón de referencia con un porcentaje de inhibición del 98 % a 1,8 mg/mL.

Las lactonas (2), (3) y (4) presentaron actividad inhibidora de la enzima  $\beta$ -lactamasa (clase C de *Enterobacter cloacae*, EC 3.5.2.6) y se comparó con la actividad inhibidora del ácido clavulánico usando la amoxicilina como sustrato. Los inhibidores se evaluaron a 5,4 mmol/L y el sustrato se evaluó entre 36 y 108 mmol/L. La actividad enzimática de los compuestos se realizó a 37 °C por 10 h a pH 7,3 y monitoreada a 250 nm.

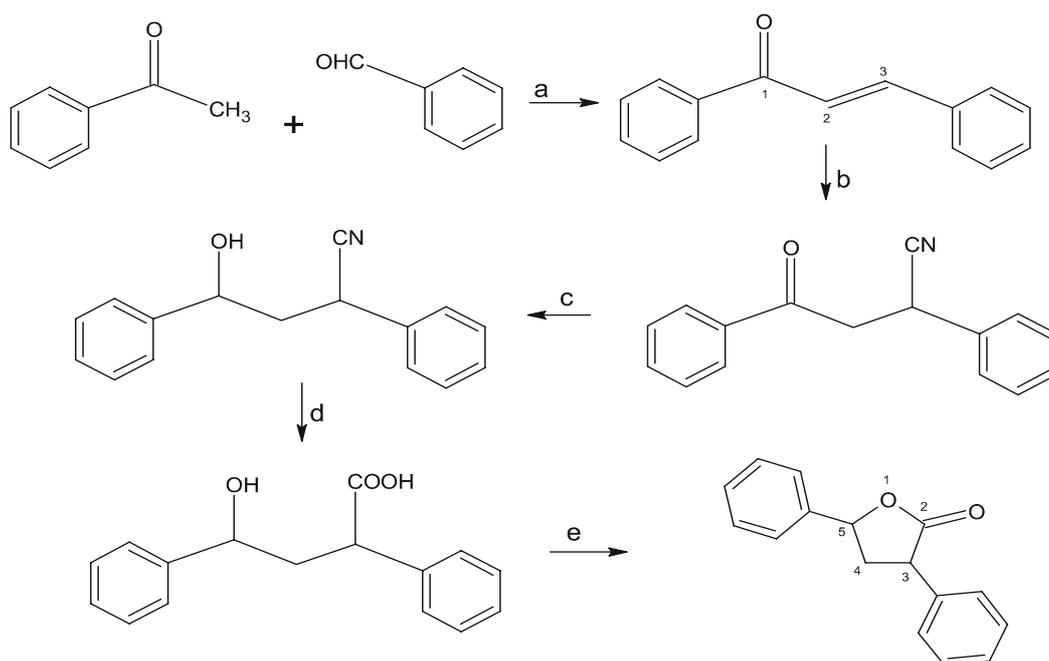
La síntesis general de las lactonas se inició con el aldehído y la acetofenona, para formar la chalcona, esta se somete a la reacción de adición de Michael para obtener el compuesto nitrilado, que después de reducir este producto e hidrolizarlo se obtiene la lactona en medio ácido (Fig. 2).

Con el fin de determinar el modo de acción de las lactonas como inhibidoras de la formación de  $\beta$ -hematina, así como de la enzima  $\beta$ -lactamasa, se realizó la optimización de la geometría de las lactonas a nivel B3LYP/6-31G y la modelación molecular de los complejos lactona-hemina a nivel B3LYP/LANL2DZ y el complejo enzimático lactona-enzima a nivel B3LYP/STO-3G



- (1)  $R^1 = p\text{-cloro-C}_6\text{H}_4$        $R^2 = p\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{N-C}_6\text{H}_4$   
 (2)  $R^1 = R^2 = \text{C}_6\text{H}_5$   
 (3)  $R^1 = p\text{-cloro-C}_6\text{H}_4$   $R^2 = \text{C}_6\text{H}_5$   
 (4)  $R^1 = p\text{-cloro-C}_6\text{H}_4$   $R^2 = \text{NC}_5\text{H}_4$

**Fig. 1.** Estructuras de las lactonas evaluadas como inhibidoras de la formación de  $\beta$ -hematina e inhibidoras de la enzima  $\beta$ -lactamasa.



**Fig. 2.** Síntesis general de las lactonas. a) NaOH, 25 °C, 1 h. b) NaCN/H<sup>+</sup>, 25 °C, 5 d. c) NaBH<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub>, 25 °C, toda la noche. d) OH<sup>-</sup>, reflujo, 6 h, e) H<sup>+</sup>, reflujo, 2 h.

usando el programa GAUSSIAN 98. El sitio activo de la enzima se obtuvo del banco de datos PDB y se diseñó de acuerdo con la enzima hidrolítica tipo Serina (1XX2, P99  $\beta$ -lactamasa de *E. cloacae*). Los péptidos usados para la modelación molecular del complejo enzima-lactona se obtuvieron de referencias,<sup>15-16</sup> el sitio activo de la enzima se modeló con los péptidos Gly63-Ser64-Ile65-Ser66-Lys67-Thr68, Leu149-Tyr150-Ala151 y Ser318-Thr319-Gly320.<sup>17</sup>

## PARTE EXPERIMENTAL

Hemina, cloroquina, NaOH, ácido acético glacial, acetato de sodio, DMSO, benzoacetofenona, *p*-cloroacetofenona, benzaldehído, *p*-dimetilaminobenzaldehído, la enzima  $\beta$ -lactamasa (clase C de *E. cloacae*, EC 3.5.2.6) y demás reactivos para la síntesis de las lactonas fueron comprados a SIGMA-ALDRICH Co.

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron obtenidos con un Bruker modelo AMX 300 (con 300,12 MHz para el núcleo <sup>1</sup>H y 75,42 MHz para el núcleo de <sup>13</sup>C), usando como disolvente CDCl<sub>3</sub> y TMS como referencia. Los espectros de RMN se obtuvieron usando modulación en J (JMOD para <sup>13</sup>C desacoplado)

La cinética de la formación del complejo se siguió por medición de la absorbancia en un espectrofotómetro Varian 50-BIO UV-Visible.

### Inhibición de la formación de $\beta$ -hematina

El procedimiento seguido está descrito.<sup>5,13-14</sup>

Cien microlitros de hemina (6,5 mmol/L) fueron disueltos en una disolución de NaOH (0,2 mol/L) 50  $\mu$ L de ácido acético glacial (17,4 mol/L) y 50  $\mu$ L de lactonas (2,0 mg/mL) o cloroquina (1,8 mg/mL) en 200  $\mu$ L de disolución reguladora de acetato pH 4,0 (3,0 mol/L). La mezcla fue incubada por 1 h a 60 °C, centrifugada a 5 366 g por 25 min y lavada con 400  $\mu$ L de DMSO. El sólido fue lavado con 600  $\mu$ L de disolución de NaOH (0,1 mol/L). La cinética de formación del complejo fue monitoreada a una longitud de onda de 386 nm en el espectrofotómetro. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### Cinética enzimática

Amoxicilina (36, 54, 72, 90, 108  $\mu$ mol/L) usada como sustrato, las lactonas (1)-(4) y el ácido clavulánico (5,4  $\mu$ mol/L) usados como inhibidores, y la enzima  $\beta$ -lactamasa (clase C de *E. cloacae*, 0,6  $\mu$ mol/L) fueron preparados en disolución reguladora de fosfato (pH 7,3) a 37 °C y la cinética enzimática fue monitoreada a una longitud de onda de 250 nm cada 5 min por 10 h. La hidrólisis de la amoxicilina decrece la absorbancia.<sup>18</sup>

### Síntesis general de lactonas

Las lactonas fueron sintetizadas de acuerdo con reportes anteriores,<sup>5,19</sup> y se siguió el procedimiento general que se describe a continuación.

### Síntesis de (1) 5-(4-clorofenil)-3-[4-(dimetilamino)fenil]dihidrofuran-2(3H)-ona

NaOH (0,15 g, 3,88 mmol) disuelto en agua (5 mL) y etanol (5 mL) fue colocado en un baño de hielo. Con agitación se adicionó 4-cloroacetofenona (0,42 mL, 500 mg, 3,23 mmol) y 4-dimetilaminobenzaldehído (0,48 g, 3,23 mmol). La mezcla fue dejada con agitación por 1 h a 25 °C y dejada en la nevera toda la noche. El precipitado fue filtrado, lavado con agua y secado, dando la chalcona: **1-(4-clorofenil)-3-(4-dimetilaminofenil)-2-propenona**, un sólido amarillo (0,92 g; 3,23 mmol; 100 % de rendimiento, Tf = 135 °C. RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  3,06 ppm (s, 6H,

2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  6,69-6,72 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos),  $\delta$  7,26 ppm ( $\delta$ , 2H, 2CH= aromáticos),  $\delta$  7,96 ppm (d, 1H, J<sub>H3-H2</sub> = 15,43),  $\delta$  7,7-7,8 ppm (d, 1H, J<sub>H2-H3</sub> = 15,43),  $\delta$  7,47-7,56 ppm (dd, 4H, 4CH= aromáticos). RMN <sup>13</sup>C:  $\delta$  40,5 ppm (2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  112,3;  $\delta$  129,2;  $\delta$  130,2 y  $\delta$  131,0 ppm (CH aromáticos),  $\delta$  116,7 ppm (C<sub>2</sub>H=),  $\delta$  146,8 ppm (C<sub>3</sub>H=),  $\delta$  122,9 ppm (C-CH=),  $\delta$  137,8 ppm (C-CO),  $\delta$  139,0 ppm (C-Cl),  $\delta$  152,6 ppm (C-N).

NaCN (2,7 g; 54,4 mmol) fue disuelto en acetona (2 mL) y agua (3 mL), la mezcla fue acidificada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 mmol/L) a pH 3. La chalcona anteriormente preparada (500 mg, 2,4 mmol) disuelta en acetona (6 mL) fue adicionada. La mezcla fue agitada durante cinco días a temperatura ambiente. Después de tres días de reacción, se adicionaron los mismos equivalentes de NaCN. La mezcla fue extraída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), lavada con disolución salina y secada con MgSO<sub>4</sub>. El disolvente fue removido bajo presión reducida y el residuo fue purificado por cromatografía de columna a presión usando la mezcla hexano-acetato de etilo (3 : 2). El compuesto **4-(4-clorofenil)-2-[4-(dimetilamino)fenil]-4-oxobutanonitrilo** fue obtenido como un sólido color café, 0,46 g; 1,50 mmol, 62 %. RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  3,0 ppm (d, 6H, 2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  3,5 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  4,4 ppm (m, 1H, CH),  $\delta$  7,2 ppm (d, 2H, CH= aromático),  $\delta$  7,4 ppm (d, 2H, CH= aromático),  $\delta$  7,8 ppm (d, 2H, CH= aromático),  $\delta$  7,9 ppm (d, 2H, CH= aromático). RMN <sup>13</sup>C:  $\delta$  31,5 ppm (CH),  $\delta$  40,5 ppm y  $\delta$  40,8 ppm (2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  45,5 ppm (CH<sub>2</sub>),  $\delta$  112,3 ppm y 113,2 ppm (2CH= aromáticos),  $\delta$  128,6 ppm y  $\delta$  129,2 ppm (2CH= aromático),  $\delta$  129,6 ppm y 129,9 ppm (2CH= aromáticos),  $\delta$  130,2 ppm y 131,0 ppm (2CH aromáticos),  $\delta$  122,9 ppm (CN),  $\delta$  127,0 ppm (C-CHCN),  $\delta$  137,9 ppm (C-CO),  $\delta$  138,9 ppm (C-Cl),  $\delta$  152,6 ppm (C-N),  $\delta$  189,7 ppm (C=O).

Del nitrilo anterior, 0,420 mg, 1,35 mmol, fueron disueltos en isopropanol (8 mL) y NaBH<sub>4</sub> (133 mg, 3,5 mmol). La mezcla fue agitada toda la noche a temperatura ambiente, después se adicionaron 10 mL de agua y HCl diluido hasta que no se produjo más H<sub>2</sub>. La mezcla fue extraída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), lavada con disolución salina y secada con MgSO<sub>4</sub>. El disolvente fue removido bajo presión reducida y el residuo fue purificado por cromatografía de columna a presión usando la mezcla hexano-acetato de etilo (3 : 2). Se obtuvo el compuesto **4-(4-clorofenil)-2-[4-(dimetilamino)fenil]-4-hidroxiobutanonitrilo** como una goma amarilla 0,39 g; 1,24 mmol, 92 %. RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  2,6 ppm (m, 2H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  2,9 ppm (d, 6H, 2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  4,6 ppm (m, 1H, CH-CN),  $\delta$  4,8 ppm (m, 1H, CH-OH),  $\delta$  6,7 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos),  $\delta$  7,1 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos),  $\delta$  7,3 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos),  $\delta$  7,4 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos). RMN <sup>13</sup>C:  $\delta$  36,16 ppm (CHCN),  $\delta$  40,0 ppm (2CH<sub>3</sub>),  $\delta$  41,0 ppm (CH<sub>2</sub>),  $\delta$  75,0 ppm (CHOH),  $\delta$  112,0 ppm (2CH= aromático),  $\delta$  127,81 ppm (2CH= aromáticos),  $\delta$  128,80 ppm y  $\delta$  129,46 ppm (2CH= aromáticos),  $\delta$  133,51 ppm (C-Cl),  $\delta$  143,70 ppm (C-CHOH-),  $\delta$  149,52 ppm (C=N),  $\delta$  119,1 ppm (C-CHCN),  $\delta$  149,5 ppm (C-N).

Del compuesto hidroxilado anteriormente preparado, 336,7 mg, 1,07 mmol, se disolvieron en 10 mL de etanol y se le adicionaron 10 mL de disolución de KOH (0,4 mol/L). La mezcla fue puesta en reflujo durante 6 h, después acidificada con HCl diluido hasta pH 2 y puesta en reflujo por 2 h. Se le adicionaron 10 mL de disolución salina y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se secó con MgSO<sub>4</sub>, se removió el disolvente bajo presión reducida y el residuo resultante fue purificado por cromatografía de columna a presión usando la mezcla hexano-acetato de etilo (9 : 1). Se obtuvo la lactona (**1**) como una goma amarilla, 186,7 mg; 0,59 mmol, 55 %. RMN <sup>1</sup>H:  $\delta$  2,1 ppm (m, 1H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  2,5 ppm (m, 1H, CH<sub>2</sub>),  $\delta$  3,0 ppm (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>),

$\delta$  4,8 ppm (t, 1H, CH-CO),  $\delta$  5,2 ppm (m, 1H, CH-O),  $\delta$  6,6 ppm (dd, 2H, 2CH= aromático),  $\delta$  6,9 ppm (s, 2H, 2CH= aromático),  $\delta$  7,0 ppm (d, 2H, CH= aromáticos),  $\delta$  7,2 ppm (d, 2H, 2CH= aromáticos). RMN  $^{13}\text{C}$ :  $\delta$  31,32 ppm ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  41,21 ppm ( $2\text{CH}_3$ ),  $\delta$  41,44 ppm (CH-CO),  $\delta$  73,62 ppm (CH-O),  $\delta$  113,28 ppm (CH= aromático),  $\delta$  113,72 ppm (CH= aromático),  $\delta$  127,81 ppm (CH= aromático),  $\delta$  128,71 ppm (CH= aromático),  $\delta$  128,99 ppm (CH= aromático),  $\delta$  129,46 ppm (CH= aromático),  $\delta$  130,0 ppm (C-CHCO),  $\delta$  133,5 ppm (C-Cl),  $\delta$  143,7 ppm (C-CHO),  $\delta$  149,5 ppm (C-N),  $\delta$  179,0 ppm (C=O).

**(2) 3,5-difenildihidrofuran-2(3H)-ona:** de color amarillo claro, 285,3 mg; 1,2 mmol, 61 %. RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  2,8 ppm (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  3,1 ppm (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,8 ppm (m, 1H, CH-CO),  $\delta$  5,1 ppm (m, 1H, CH-O),  $\delta$  7,0-7,4 ppm (m, 10H, 10CH= aromáticos). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como referencia):  $\delta$  39,0 ppm ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  44,0 ppm (CH-C=O),  $\delta$  80,8 ppm (CH-O),  $\delta$  125,0-129,5 ppm (10CH= aromáticos),  $\delta$  137,0 ppm (C-CHCO),  $\delta$  140,0 ppm (C-CHO),  $\delta$  178,0 ppm (C=O).

**(3) 5-(4-clorofenil)-3-fenildihidrofuran-2(3H)-ona:** Goma de color amarillo claro, 120 mg; 0,44 mmol, 57 %. RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  2,0 ppm (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,6 ppm (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,6 ppm (t, 1H, CH-CO),  $\delta$  5,5 ppm (m, 1H, CH-O),  $\delta$  7,1-7,4 ppm (m, 9H, 9CH= aromático). RMN  $^{13}\text{C}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como referencia):  $\delta$  32,4 ppm ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  40,9 ppm (CH-CO),  $\delta$  73,5 ppm (CH-O),  $\delta$  127,4 ppm (2CH=CCHCO aromático),  $\delta$  127,8 ppm (2CH= aromático),  $\delta$  128,9 ppm (CH= aromático),  $\delta$  129,1 ppm (2CH=CCl),  $\delta$  129,4 ppm (2CH=CCH-O),  $\delta$  133,6 ppm (C-Cl),  $\delta$  142,0 ppm (C-CHCO),  $\delta$  143,6 ppm (C-CHO),  $\delta$  176,5 ppm (C=O).

**(4) 5-(4-clorofenil)-3-piridin-4-ildihidrofuran-2(3H)-ona:** goma blanca, 176,7 mg, 0,69 mmol, 68 %. RMN  $^1\text{H}$ :  $\delta$  1,9 ppm (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  2,4 ppm (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  4,3 ppm (t, 1H, CH-CO),  $\delta$  5,3 ppm (m, 1H, CH-O),  $\delta$  6,9 ppm (m, 2H, 2CH= piridinil),  $\delta$  7,0-7,1 ppm (m, 4H, 4CH= aromático),  $\delta$  8,1 ppm (m, 2H, 2CH= piridinil). RMN  $^{13}\text{C}$ : ( $\text{CDCl}_3$ , TMS como referencia):  $\delta$  38,7 ppm ( $\text{CH}_2$ ),  $\delta$  44,72 ppm (CH-CO),  $\delta$  71,78 ppm (CH-O),  $\delta$  127,8 ppm (2CH= piridinil),  $\delta$  129-129,1 ppm (4CH= aromático),  $\delta$  152 ppm (2CH= piridinil),  $\delta$  133,9 ppm (C-Cl),  $\delta$  142,7 ppm (C-CHO),  $\delta$  143,8 ppm (C-CHCO),  $\delta$  177,0 ppm (C=O).

### Detalles computacionales

Todos los estudios computacionales fueron realizados usando el programa Gaussian 98. Los parámetros geométricos de los compuestos y los complejos lactona-hemina fueron optimizados usando el nivel B3LYP/6-31G y B3LYP/LANL2DZ, respectivamente. Igualmente, los de los complejos enzimáticos fueron optimizados usando el nivel B3LYP/STO-3G.<sup>20-21</sup> Para el diseño del sitio activo de la enzima se siguió la metodología de Kumar y Lobkovski.<sup>15-16</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de las lactonas ofreció un rendimiento total promedio del 18 %. Las lactonas se obtuvieron como una mezcla isomérica en relación de 50 : 50, la cual correspondió a los isómeros (*R,R*), (*S,S*) y (*R,S*), (*S,R*) de cada una de las lactonas, espectroscópicamente se observaron por RMN  $^{13}\text{C}$  los isómeros formados. En el caso de los compuestos nitrilados, se observó un grupo  $\text{CH}_2$ , indicativo del par enantiomérico (*R*) y (*S*). En los compuestos hidroxilados, se observaron dos señales correspondientes a dos pares de enantiómeros (*R,R*), (*S,S*) y (*R,S*), (*S,R*) y en las lactonas, las dos señales de  $\text{CH}_2$  correspondientes a las lactonas enantioméricas. La formación de las lactonas (3*S*,5*S*) y (3*R*,5*R*) sería posible si en la reacción de reducción con  $\text{NaBH}_4$ , el hidruro ata-

cara por la misma cara del grupo -CN. Para la reacción de esterificación y formación de las lactonas (3*S*,5*S*) y (3*R*,5*R*), se requería que el enlace  $\text{CH}_2$ -CHCOOH girara y se ubicara en forma paralela al grupo hidroxilo de tal forma que facilitara el ataque del nucleófilo del OH al carbono carboxílico.<sup>16</sup> La optimización de la geometría de la lactona (4) muestra que todos los isómeros tienen la misma probabilidad de formarse, ya que cada una de ellos presenta una energía semejante (Tabla 1).

La diferencia en energía de las lactonas (*R,R*), (*S,S*) y las (*S,R*), (*R,S*) es de 2,51 kcal/mol, siendo estos dos últi-

**Tabla 1.** Energía de las lactonas (3*R*,5*R*), (3*S*,5*R*), (3*R*,5*S*) y (3*S*,5*S*)-5-(4-clorofenil)-3-piridin-4-ildihidrofuran-2-ona formadas en la reacción de esterificación en medio ácido. Las energías fueron calculadas en Gaussian 98 a nivel B3LYP/6-31G.<sup>22</sup>

Lactona (4)	Energía (a.u.)
(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )-lactona	-1 243,976
(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-lactona	-1 243,976
(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-lactona	-1 243,980
(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-lactona	-1 243,980

mos enantiómeros más estables que los primeros. Por lo tanto, la modelación molecular se realizó con las lactonas más reactivas.

### Actividad inhibidora de la formación de $\beta$ -hematina

Al evaluar a las lactonas (1)-(4) como inhibidoras de la formación de  $\beta$ -hematina se comprobó que la cloroquina inhibe en un 98 % la formación de la  $\beta$ -hematina (Tabla 2) y según se reporta en trabajos anteriormente publicados,<sup>5</sup> el nitrógeno quinolinico de la cloroquina establece enlace con el Fe porfirínico de la hemina.<sup>23</sup> En el caso de las lactonas, la modelación de la geometría de los complejos hemina-lactona muestra que el enlace del complejo formado se establece a través del oxígeno del anillo furano de la lactona y el Fe central del anillo porfirínico de la hemina (Fig. 3). La distancia entre la lactona y el Fe central de la hemina no es determinante como para que afecte la actividad biológica.

La modelación muestra que en el complejo hemina-lactona el anillo porfirínico es totalmente planar y la dirección del anillo lactónico es un poco inclinada, debido a la nube electrónica negativa que generan en el anillo los átomos de oxígeno que interactúan con la nube positiva del anillo de la hemina; mientras que los anillos aromáticos de la lactona son perpendiculares, por lo que no se establece interacción entre estos y el ani-

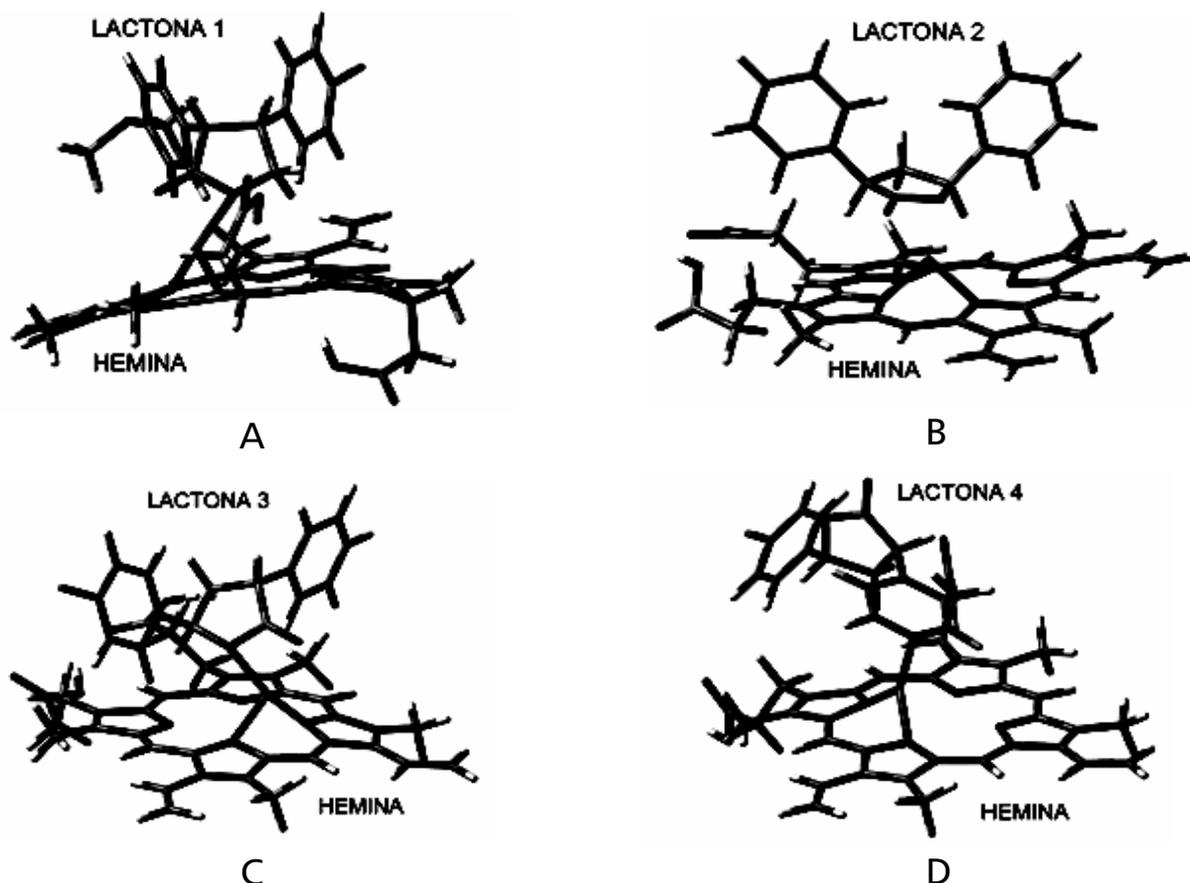
**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de las lactonas y cloroquina sobre la formación de  $\beta$ -hematina y distancia entre el Fe central porfirínico y el oxígeno o nitrógeno de los complejos formados, usando Gaussian 98 a nivel B3LYP/LANL2DZ.<sup>22</sup>

Compuesto	Porcentaje de inhibición de la formación de $\beta$ -hematina	Complejo hemina-compuesto	Distancia interatómica (Å)
Cloroquina	98,0	Fe-N	1,91
(1)	26,0	Fe-O	1,92
(2)	33,0	Fe-O	1,97
(3)	50,0	Fe-O	1,93
(4)	40,0	Fe-N	1,93

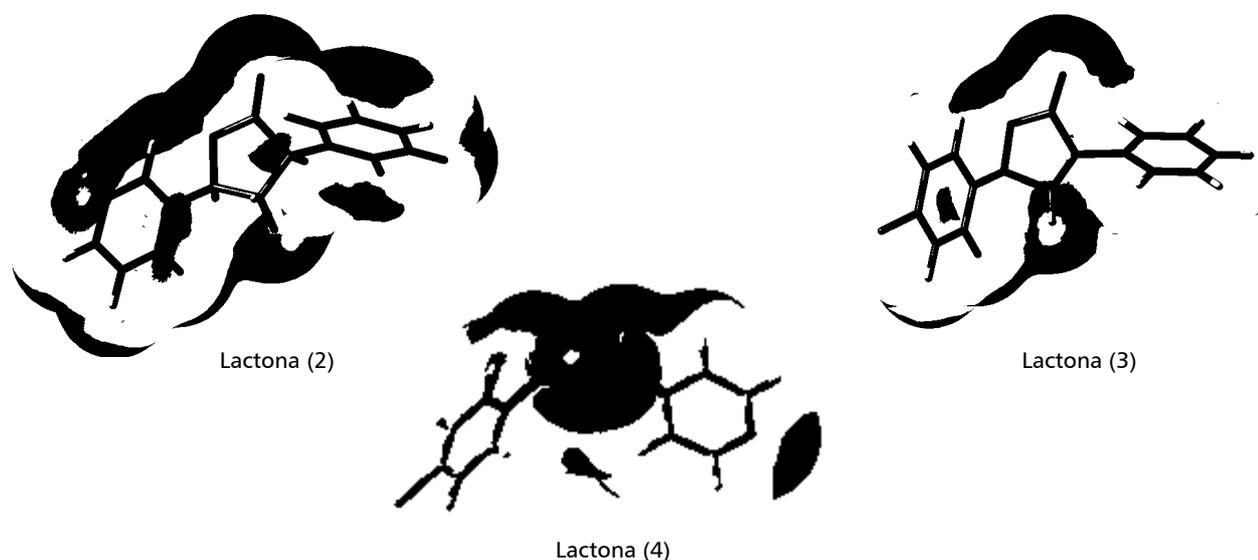
llo porfirínico de la hemina. En el caso del complejo hemina-lactona (4), la interacción entre el átomo de Fe central porfirínico y la lactona es a través del nitrógeno piridínico. Esto demuestra la preferencia del Fe por el par de electrones del nitrógeno, además, la lactona (4) tiene la carga negativa centrada en el anillo piridínico, lo que hace al nitrógeno más nucleófilo y más susceptible de un ataque electrofílico que el oxígeno del anillo lactónico, pero la interacción es favorecida si el nitrógeno es aromático, debido a la distribución de la carga, caso que no se observa en la lactona (1)

que a pesar de presentar un nitrógeno, este no es aromático. La lactona (3) tiene la carga negativa distribuida en el anillo furánico, por lo tanto, la interacción se establece a través del oxígeno furánico, que es más negativo que el oxígeno carbonílico. La figura 4 muestra la densidad electrónica de las lactonas (2), (3) y (4).

El perfil electrónico muestra una carga negativa centrada en el anillo aromático piridínico de la lactona (4) que favorece el ataque electrofílico del Fe porfirínico al nitrógeno piridínico. Los anillos aromáticos de las lactonas presentan una carga positiva por lo cual no



**Fig. 3.** Geometrías optimizadas de los complejos hemina-lactonas en B3LYP/LANL2DZ. Complejos: A) Hemina-lactona (1). B) Hemina-lactona (2). C) Hemina-lactona (3). D) Hemina-lactona (4).



**Fig. 4.** Densidad electrónica de las lactonas (2), (3) y (4) optimizadas en Gaussian 98 nivel B3LYP/6-31G.<sup>22</sup>

existe una interacción entre la nube electrónica positiva del anillo porfirínico de la hemina y los anillos aromáticos, lo que explica su ubicación perpendicular en el complejo hemina-lactona.

**Actividad inhibidora de la enzima  $\beta$ -lactamasa**

Las lactonas (3) y (4) fueron mejores inhibidores competitivos enzimáticos que el ácido clavulánico, pero no existieron diferencias en las actividades enzimáticas de estas; ambas mostraron igual  $K_M$  aparente,  $K'_M$  (Tabla 3).

El sitio activo de la enzima  $\alpha$ -lactamasa tiene un potencial electrostático positivo,<sup>15-16</sup> que favorece la interacción con la nube electrónica negativa del anillo lactónico. La adición de un grupo electrón atractor como el Cl en el  $\nu$ -anillo aromático, no afecta la actividad inhibidora del compuesto, según el perfil electrónico, la lactona (3) tiene una carga más positiva sobre el  $\nu$ -anillo que la lactona (2) debido a la presencia del grupo electrón atractor, pero cuando la lactona tiene un nitrógeno en el  $\alpha$ -anillo aromático hace que este compuesto tenga una nube electrónica más negativa que las lactonas (2) y (3), lo que permite la interacción en el sitio activo a través del  $\alpha$ -anillo aromático de la lactona (4), que hace que presente menor  $K'_M$  aparente, siendo mal inhibidor enzimático (Fig. 4).

Con el fin de determinar el modo de interacción de las lactonas en el sitio activo de la enzima, se modelaron las lactonas (2) y (4) interactuando con los péptidos Gly63-Ser64-Ile65-Ser66-Lys67-Thr68, Leu149-Tyr150-Ala151 y Ser318-Thr319-Gly320 (Fig. 5).

La optimización de la geometría de los complejos enzima-lactona mostró que la interacción en el complejo enzima-inhibidor se establece a través de enlaces de hidrógeno establecidos entre los grupos hidroxilo de la Ser64 y la Tyr150 con el oxígeno carbonílico del núcleo lactónico (Tabla 4).

Los enlaces de hidrógeno establecidos entre los residuos Ser64 y la Tyr150 y el oxígeno carbonílico de la lactona (2) son fuertes y no existe interacción entre el hidroxilo del residuo Ser64 y el oxígeno furánico. Esto

indicaría que el residuo Ser64 atacaría el carbonilo de la lactona para formar el complejo enzima-lactona (2).

De acuerdo con las distancias en la modelación entre la lactona (4) y los residuos Ser64 y Tyr150 del sitio activo se forman interacciones de van der Waals débiles con el núcleo lactónico y no hay interacción con el anillo piridínico, lo que explicaría la disminución en la actividad inhibidora de la lactona (4). La carga negativa del anillo piridínico ayudaría a la atracción electrostática entre la lactona y el sitio activo de la enzima, pero como no se establecen interacciones fuertes dentro del sitio activo, la actividad enzimática no se ve favorecida.

**CONCLUSIONES**

La búsqueda de alternativas para erradicar la resistencia microbiana se hace necesaria y urgente.

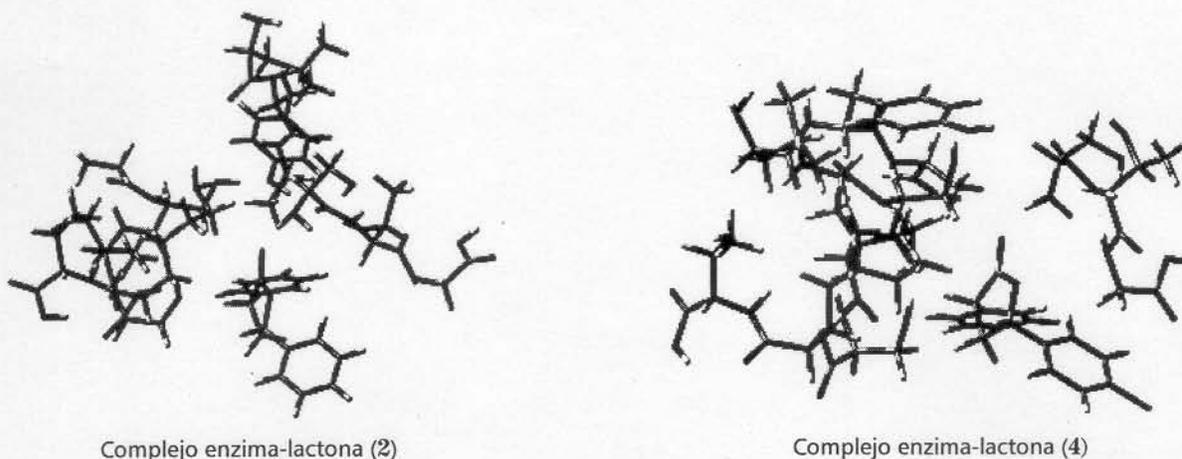
Un blanco molecular importante para evaluar compuestos como potenciales antimarísticos es la evaluación de la inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina, la cual es un complejo entre el Fe porfirínico de la hemina y los grupos carboxilo del anillo porfirínico. La inhibición de la formación de este complejo por las lactonas se logra por el enlace que se establece entre el oxígeno del anillo

**Tabla 4.** Distancias entre el grupo OH de los residuos del sitio activo de la enzima  $\beta$ -lactamasa, Ser64 y la Tyr150 y las lactonas (2) y (4).<sup>22</sup>

Compuesto	Complejo enzima-lactona	Distancia interatómica (Å)
Lactona (2)	SerOH—O=C	3,43
	TyrOH—O=C	3,27
	SerOH—O	5,66
Lactona (4)	SerOH—O=C	4,96
	TyrOH—O=C	4,00
	SerOH—O	5,78

**Tabla 3.** Velocidad enzimática,  $K'_M$  y tipo de inhibición producidas por la presencia de las lactonas y el ácido clavulánico.

Compuesto	Vmax ( $\mu$ mol/Lmin)	$K_M$ ( $\mu$ mol/L)	$K'_M$ ( $\mu$ mol/L)	Tipo de inhibidor
Amoxicilina	$3,40 \cdot 10^{-4}$	154,0		
Ácido clavulánico	$3,47 \cdot 10^{-4}$		217,2	Competitivo
(2)	$3,402 \cdot 10^{-4}$		236,3	Competitivo
(3)	$3,403 \cdot 10^{-4}$		236,2	Competitivo
(4)	$3,401 \cdot 10^{-4}$		168,3	Competitivo



**Fig. 5.** Geometría optimizada del complejo enzima-lactona (2) y enzima-lactona (4) en el sitio activo de la enzima  $\beta$ -lactamasa modelado en Gaussian 98 a nivel B3LYP/STO-3G.<sup>22</sup>

lactónico y el Fe central del anillo porfirínico. Si los anillos aromáticos tienen un nitrógeno piridínico, se forma una carga electrónica sobre este anillo, de tal forma que lo hace más nucleofílico y por ende, más susceptible del ataque electrofílico por parte del Fe de la hemina. Los anillos aromáticos de la lactona no intervienen en la interacción con el anillo porfirínico debido a la carga electrónica positiva distribuida en ellos, por lo tanto, la interacción entre ambos anillos es perpendicular.

Para el diseño de compuestos con actividad inhibidora de  $\beta$ -hematina es importante tener en cuenta la nube electrónica negativa distribuida en toda la molécula, la cual es favorecida por sustituyentes electrón donadores o átomos con pares de electrones libres, que hacen que esta región sea más susceptible al ataque del Fe de la hemina. Las cargas electrónicas pueden controlar principalmente la actividad inhibidora de la formación de  $\beta$ -hematina, lo que se convierte en un potencial método para determinar la actividad antimalárica. El diseño de nuevas lactonas derivadas con actividad antimalárica basado sobre el perfil electrónico puede ser también una forma de relación estructura-actividad de compuestos activos.

Teniendo en cuenta el potencial electrostático del sitio activo de la enzima  $\beta$ -lactamasa, se diseñaron compuestos con una carga negativa centrada en el anillo lactónico. La densidad electrónica negativa de las lactonas facilitaría la interacción del compuesto dentro del sitio activo y por ende, la formación de un complejo enzima-inhibidor estable. Mientras la lactona pueda establecer enlaces de hidrógeno fuertes con los residuos del sitio activo de la enzima, la actividad enzimática aumentará y se obtendrá un mejor inhibidor.

Para el diseño de compuestos inhibidores de la enzima  $\beta$ -lactamasa se debe considerar una carga electrónica negativa distribuida alrededor del núcleo farmacóforo que permita la atracción electrostática, y que contenga sustituyentes que favorezcan la formación de enlaces de hidrógeno fuertes con los residuos del sitio activo de la enzima.

## AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Físico Química Orgánica de la Universidad Nacional, sede Medellín, por la modelación de los complejos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barret S.P. What's new in... Infection control. **Medicine**, **34**, 1-3, 2006.
- Jaramillo V.E.L. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de cuidados intensivos, Hospital de Caldas, 1992-1994. **Colombia Medica**, **27**, 69-76, 1996.
- Zeba B. Review. Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drugs resistance. **Africa Journal of Biotechnology**, **4**, 13, 1559-1562, 2005
- Pineda Granados F.Y., Valero V., Agudelo C.C.A. Evaluación del programa de control de la malaria en la Amazonía Colombiana. **Rev. Salud Pública**, **6**, Sup. 1, 40-49, 2004.
- Jaramillo C., Mora C., Bravo K., Muñoz K., Arango G. J., and Quijano J. Theoretical Study of Aromatic Compounds with Inhibitory Activity of  $\alpha$ -hematin Formation. **Pharmacologyonline**, **3**, 563-568, 2006.
- Poveda G., Rojas W., Quiñones M.L., Vélez I.D., Mantilla R.I., Ruiz D., *et al.* Coupling between Annual and ENSO Timescales in the Malaria-Climate Association in Colombia. **Environmental Health Perspectives**, **109**, 489-493, 2001.
- Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de Vigilancia en Salud Pública, SIVIGILA. Semana epidemiológica 50, del 9 de diciembre de 2007 al 15 de diciembre de 2007, Colombia.

- Parapini S., Basilico N., Pasini E., Egan T.J., Olliaro P., Taramelli D., *et al.* Standardization of the Physicochemical Parameters to Assess *in Vitro* the  $\alpha$ -Hematin Inhibitory Activity of Antimalarial Drugs. **Experimental Parasitology**, **96**, 249-256, 2000.
- Steele, J.C.P., Phelps R.J., Simmonds M.S.J., Warthurst D. C. and Meyer D.J. Two novel assays for the detection of haem-binding properties of antimalarials evaluated with compounds isolated from medicinal plants. **J. of Antimicrobial Chemotherapy**, **50**, 25-31, 2002.
- Protti S., Fagnoni M., and Albini A. Benzyl (Phenyl)  $\gamma$ - and  $\delta$ -lactones via Photoinduced Tandem Ar-C, C-O Bond formation. **J. Am. Chem. Soc.**, **128**, 10670-10671, 2006.
- Livermore D. M. Introduction: the challenge of multiresistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **29** Suppl. 3, S1-S7, 2007.
- Buller R., Peterson M. L., Almarsson Ö., Leiserowitz L. Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design. **Crystal Growth & Design**, **2**, 553-562, 2002.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Bravo, J.A., *et al.* A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **J. of Ethnopharmacology**, **69**, 127-137, 2000.
- Baelmans R., Deharo E., Bourdy G., Muñoz V., Quenevo C., Sauvain M. and Ginsburg H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products. **J. of Ethnopharmacology**, **73**, 271-275, 2000.
- Kumar S., Pearson A.L., Pratt R.F. Design, Synthesis, and Evaluation of  $\alpha$ -Ketoheterocycles as Class C  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, **9**, 2035-2044, 2001.
- Lobkovsky E., Billings E., Moews P.C., Rahi J., Pratt R.F., Knox J.R. Crystallographic Structure of a Phosphonate Derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 Cephalosporinase: Mechanistic Interpretation of a  $\beta$ -Lactamase Transition-State Analog? **Biochemistry**, **33**, 6762-6772, 1994.
- Jaramillo C. Síntesis de chalconas y lactones, evaluación de la actividad inhibitoria de  $\beta$ -lactamasa y de la formación de  $\beta$ -hematina. Tesis doctoral en Ciencias Químicas. Universidad de Antioquia, Colombia, marzo, 2008.
- Jaramillo C., Mora C., Bravo K., Muñoz K., Arango G.J., Quijano J. Biological Evaluation of Aromatic Compounds as  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Pharmacologyonline* **3**, 650-655, 2006
- Brian S.F., Hannaford A.J., Smith P.W. and Tatchell Austin R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5th edition. Ed. Pearson, London, 1034, 1989.
- Kamaljit K., Pratt R.F. Mechanism of Reaction of Acyl Phosphonates with the  $\beta$ -Lactamase of *Enterobacter cloacae* P99. **Biochemistry**, **40**, 4610-4621, 2001.
- Fenollar-Ferrer C., Frau J., Vilanova B., Donoso J., Muñoz F. Molecular Modelling Studies on Henry-Michaelis Complexes of a Class-C  $\beta$ -lactamase and  $\beta$ -lactam compounds. **J. Molecular Structure (theochem)**, **578**, 19-28, 2002.
- Gaussian 98, revisión A. 9, Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery J.A. Jr., Stratmann R.E., Burant J.C. Dapprich S., J.M. Millam, A. D. Daniels, K.N. Kudin, Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Gonzalez C., Head-Gordon M., Replogle E.S., and Pople J.A., Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- Pagola S., Stephen P.W., Bohle D.S., Kosar A.D., Madsen S. K. The structure of malaria pigment  $\alpha$ -haematin. **Nature**, **404**, 16, 307-310, 2000.