



ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD ACOPLADOS A CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA

Departamento de Química Orgánica. FCEN-UBA
Curso de posgrado a dictarse en Verano 2021

Profesores:

Ricardo Luis Eugenio Furlán (Docente responsable).
Investigador Principal (CONICET), Profesor Asociado (Farmacognosia, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR). Dr. Cs. Químicas, Farmacéutico.

María Pilar Buera
Investigador Superior (CONICET) Profesora Titular Regular. DQO-FCEN-UBA

Colaboradores: I. Ayelén Ramallo, Dra. Cs. Químicas, Lic. Biotecnología. Mario O. Salazar, Dr. Cs. Químicas, Farmacéutico. Ignacio Cabezudo, Dr. Cs. Químicas, Lic. Química.

Duración total en horas	24
Duración en semanas	1

Número de horas de clases teóricas	10
Número de horas de clases de problemas	10
Número de horas de seminarios	4

Forma de evaluación:	
Discusión Dirigida de Trabajos de Investigación en el tema	
Lugar propuesto para el dictado (departamento, laboratorio, campo, etc.):	
Virtual (Sincrónica)	
Puntaje propuesto para la carrera de doctorado:	1 punto

Número de alumnos:	Mínimo: 5	Máximo: 20
--------------------	-----------	------------

Audiencia a quien está dirigido el curso:
Alumnos de Doctorado en Cs. Químicas

Necesidades materiales del curso:
Plataforma virtual

PROGRAMA ANALÍTICO

Introducción.

Detección de compuestos bioactivos en mezclas. Fraccionamiento biodirigido, análisis basado en efecto y metodologías relacionadas.

Aspectos generales de los ensayos bioautograficos. Historia. Posibles aplicaciones.

Acoplamiento cromatografía en capa delgada (CCD) y bioensayos.

Cromatografía como soporte de ensayos biológicos. Aspectos relacionados que afectan al acoplamiento con bioensayos. La importancia del soporte. Fase normal vs otras fases, efectos, compatibilidad. CCD vs CCD de alta eficiencia. Automatización. Importancia de la resolución. Falsos negativos por cuestiones de interfase.

Detección: Tipos de bio-detección. Ensayos microbiológicos, bioquímicos y microquímicos.

Características analíticas de estos ensayos: Límite de detección, límite de cuantificación, robustez, reproducibilidad, etc.

Documentación de las imágenes bioautográficas: medición de absorbancia en las bioautografías, análisis de imágenes y software disponibles.

Cuantificación de bioactividad en experimentos bioautográficos. Uso de análisis multivariado.

Ensayos Químicos sobre CCD. Detección de antioxidantes

Importancia biológica de los antioxidantes y su detección.

Generalidades de los ensayos, mecanismo de cada ensayo antioxidante. Versiones existentes en TLC. Ensayos de beta-caroteno. Ensayos de captación de superóxido. Ensayos antioxidantes que emplean radical DPPH. Ensayos antioxidantes que emplean radical ABTS. Ejemplos. Comparaciones entre métodos.

Ensayos Bioquímicos sobre CCD. Detección de inhibidores enzimáticos

Importancia biológica de los antioxidantes y su detección. Generalidades de los ensayos,

Ensayos sobre CCD de hidrolasas: acetil y butiril-colinesterasa, α - y β -glucosidasa, α -amilasa, lipasa, dipeptidil peptidasa, tripsina, neuroaminasa, ureasa y arginasa.

Ensayos sobre CCD de oxidoreductasas: xantina oxidasa, peroxidasa, monoamina oxidasa, tirosinasa y polifenoloxidasas.

Ensayos sobre CCD de isomerasas: glucosa-6-fosfato isomerasa.

Aspectos experimentales a tener en consideración de los ensayos autográficos biomoleculares:

Dosificación de la enzima. Compatibilidad con el soporte sólido, formas de aplicar (inmovilización o spray), fases móviles, buffers, sustratos, revelado y falsos positivos. Herramientas empleadas.

Aspectos experimentales a tener en consideración de los ensayos enzimáticos sobre CCD: Cantidad de enzima. Compatibilidad con el soporte sólido, formas de aplicar (inmovilización o spray), fases móviles, buffers, sustratos, revelado y falsos positivos. Herramientas empleadas para la optimización.

Ensayos microbiológicos sobre CCD.

Generalidades. Aspectos experimentales a tener en cuenta cuando se trabaja con microorganismos (condiciones de cultivo, medición de la masa celular, incubación, posibles contaminantes).

Tipos de revelado de bioactividad. Métodos químicos y empleo de genes reporteros.

Ensayos bioautográficos para la búsqueda de antimicrobianos, inhibición del crecimiento de hongos y bacterias.

Ensayos con microorganismos modificados como herramienta para la medición de otras actividades:

Actividad inhibitoria del sistema de dos componentes PhoP/Q; actividad estrogénica

Acoplamiento de Ensayos sobre CCD con espectrometría

Generalidades del acoplamiento de TLC con espectrometría.

Acoplamiento de TLC-bioautografía-MS. Algoritmo BIOMSID y sus aplicaciones.

Acoplamiento de TLC-bioautografía-NMR.

Bibliografía

- Legerská, B.; Chmelová, D.; Ondrejovič, M.; Miertuš, S. (2020). The TLC-Bioautography as a Tool for Rapid Enzyme Inhibitors detection – A Review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, DOI: 10.1080/10408347.2020.1797467
- Bräm, S.; Wolfram, E. (2017). Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography. *Phytochemical Analysis*, DOI: 10.1002/pca.2669
- Cieśla, L. M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Wojtunik, K. A.; Hajnos, M. (2015). Thin-layer chromatography coupled with biological detection to screen natural mixtures for potential drug leads. *Phytochemistry Letters* DOI: 10.1016/j.phytol.2015.02.005
- Urbain, A.; Simões-Pires, C. A. (2014). Thin-Layer Chromatography, with Chemical and Biological Detection Methods. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470027318.a9907
- Weller, M. G. (2012). A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. *Sensors*. DOI:10.3390/s120709181
- Choma, I.M.; Grzelak, E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A*. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.069
- Marston, A. (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *J. Chromatogr. A*. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.12.068.
- Morlock, G.; Schwack, W. (2010). Hyphenations in planar chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 6600–6609. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.058.
- Weins, C. (2008). Overview of bioactivity-based analysis by HPTLC. bridging the gap between cause and effect—HPTLC detection of bioactive compounds in the environment and in food. *J. Planar Chromat.* DOI: 10.1556/JPC.21.2008.6.2
- Srivastava, M. (2011) High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-14025-9
- Müller, M. B.; Dausend, C.; Weins, C.; Frimmel, F. H. A New Bioautographic Screening Method for the Detection of Estrogenic Compounds. *Chromatographia* 2004, 60 (3), 207–211.
- Grzelak, E. M.; Majer-Dziedzic, B.; Choma, I. M.; Pilorz, K. M. Development of a Novel Direct Bioautography-Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Positive Bacteria, *Bacillus Subtilis*. *J. AOAC Int.* 2013, 96 (2), 386–391.
- Grzelak, E. M.; Majer-Dziedzic, B.; Choma, I. M. Development of a Novel Direct Bioautography-Thin-Layer Chromatography Test: Optimization of Growth Conditions for Gram-Negative Bacteria, *Escherichia Coli*. *J. AOAC Int.* 2011, 94 (5), 1567–1572.
- Salazar, M. O.; Viarengo, G.; Sciara, M. I.; Kieffer, P. M.; Garcia Vescovi, E.; Furlan, R. L. E. A Thin-Layer Chromatography Autographic Method for the Detection of Inhibitors of the Salmonella PhoP–PhoQ Regulatory System. *Phytochem. Anal.* 2014, 25 (2), 155–160.
- Dewanjee, S.; Gangopadhyay, M.; Bhattacharya, N.; Khanra, R.; Dua, T. K. Bioautography and Its Scope in the Field of Natural Product Chemistry. *J. Pharm. Anal.* 2015, 5 (2), 75–84.
- Agatonovic-Kustrin, S., Morton, D. W., & Yusof, A. P. (2016). Development and validation of a simple high performance thin layer chromatography method combined with direct 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay to quantify free radical scavenging activity in wine. *Food Chemistry*, 197, 285–290.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.128>

Olech, M., Komsta, Ł., Nowak, R., Cieśla, Ł., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2012). Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing. *Food Chemistry*, 132(1), 549–553. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.067>

Ramallo, I. A.; Salazar, M. O.; Furlan, R. L. (2020). Enzymatic Bioautographic Methods. In *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development*. Ch 12. DOI: 10.1007/978-1-0716-0163-1

Ramallo, I. A.; Salazar, M. O.; Furlan, R. L. E. (2015). Thin Layer Chromatography-Autography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis: Accelerating the Identification of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Phytochem. Anal.* DOI: 10.1002/pca.2574

Grzelak, E. M.; Hwang, C.; Cai, G.; Nam, J.-W.; Choules, M. P.; Gao, W.; Lankin, D. C.; McAlpine, J. B.; Mulugeta, S. G.; Napolitano, J. G.; Suh, J.-W.; Yang, S. H.; Cheng, J.; Lee, H.; Kim, J.-Y.; Cho, S.-H.; Pauli, G. F.; Franzblau, S. G.; Jaki, B. U. (2016). Bioautography with TLC-MS/NMR for Rapid Discovery of Anti-Tuberculosis Lead Compounds from Natural Sources. *ACS Infect. Dis.* DOI: 10.1021/acsinfecdis.5b00150

Móricz, Á. M.; Häbe, T. T.; Ott, P. G.; Morlock, G. E. (2019). Comparison of High-Performance Thin-Layer with Overpressured Layer Chromatography Combined with Direct Bioautography and Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for Tansy Root. *J. Chromatogr. A*. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.03.068

Cabezudo, I.; Ayelen Ramallo, I.; Alonso, V. L.; Furlan, R. L. E. (2021). Effect Directed Synthesis of a New Tyrosinase Inhibitor with Anti-Browning Activity. *Food Chem.* DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128232.

Actividades prácticas propuestas

Análisis de trabajos de investigación recientes y discusión:

Discusión de aspectos experimentales a tener en consideración en ensayos autográficos biomoleculares: Actividad de la enzima. Compatibilidad con el soporte sólido, formas de aplicar el sistema revelador, fases móviles, buffers, sustratos, revelado y falsos positivos. Herramientas empleadas para la optimización.

Análisis de ejemplos de la aplicación de ensayos para evaluar antioxidantes sobre CCD. Discusión de aspectos experimentales.

Posibilidades que otorga el uso de equipos de cromatografía en capa delgada de alta eficiencia en cuanto a resolución, cuantificación, reproducibilidad, etc.

Análisis de trabajos de acoplamiento de ensayos sobre CCD con espectrometría